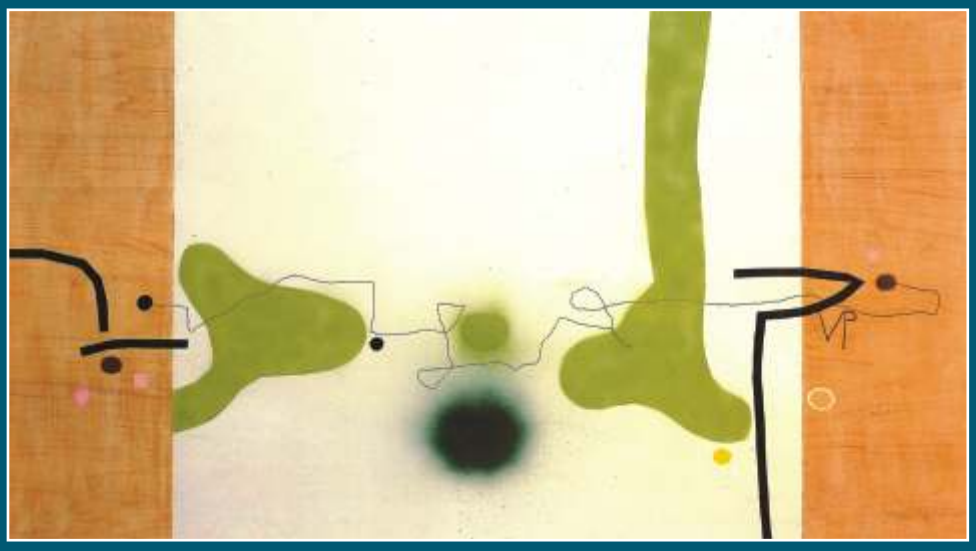
Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune



Juan-Manuel Anaya

Yehuda Shoenfeld

Paula A. Correa

Mario García-Carrasco

Ricard Cervera

CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

VISIT…

Autoinmunidad
y
Enfermedad Autoinmune

Autoinmunidad
y
Enfermedad Autoinmune

Juan-Manuel Anaya, MD
Investigador Titular, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética,
Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Yehuda Shoenfeld, MD
Jefe, Servicio de Medicina Interna "B" y
Centro para Enfermedades Autoinmunes, Centro Médico Sheba, Tel-Hashomer,
y Facultad de Medicina Sackler, Universidad de Tel-Aviv, Israel

Paula A. Correa, MSc
Investigadora Asociada, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética,
Corporación para Investigaciones Biológicas;
Profesor Asistente, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Mario García-Carrasco, MD, PhD
Profesor Titular de Inmunología, Facultad de Medicina, BUAP Puebla;
Servicio de Reumatología, Hospital General No. 36 de SMN,
Instituto Mexicano del Seguro Social "Manuel Ávila Camacho" Puebla, México

Ricard Cervera, MD, PhD
Servicio de Enfermedades Autoinmunes, Instituto Clínico de Medicina y Dermatología,
Hospital Clínico, Barcelona, Cataluña, España

CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Parte de los resultados presentados en este libro son producto de investigaciones financiadas por Colciencias.

Primera edición 2005

© 2005 por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Reservados todos los derechos. Ni todo el libro ni parte de él pueden ser reproducidos, archivados o transmitidos en forma alguna o mediante algún sistema electrónico, mecánico o de fotorreproducción, memoria o cualquier otro, sin permiso por escrito del editor.

ISBN:

Ilustración de la carátula: Victor Pasmore, Sin título, 1989.
Diseño y diagramación: Alicia Calle D.
Impresión y terminación:

Hecho en Colombia

CIB - Apartado Aéreo 7378
Teléfono 4410855
Fax 4415514
cib@cib.org.co
autoinmunidad@cib.org.co
Medellín, Colombia

PRÓLOGO

Paradójicamente, un componente importante del sistema inmune, la inmunidad adquirida, que evolutivamente se ha perfeccionado para defendernos de agresores externos e internos, se torna en nuestra contra, sin razones claras, ocasionando al 5% de los seres humanos afecciones que son molestas unas, incapacitantes otras, y graves y aún mortales varias de ellas.

La última década ha sido especialmente fecunda en el esclarecimiento de los mecanismos responsables de reacciones autoinmunes y en el desarrollo de nuevas técnicas moleculares que permiten lograr diagnósticos más precisos y mejores enfoques terapéuticos.

Desafortunadamente las investigaciones responsables de estos importantes logros no han recibido adecuada difusión, y son muchos los profesionales de la salud que por tener un conocimiento incompleto de ellos, no están beneficiando a sus pacientes con su aplicación.

Resulta por lo tanto altamente útil y oportuno el trabajo de Juan-Manuel Anaya, Yehuda Shoenfeld, Paula A. Correa, Mario García-Carrasco y Ricard Cervera, para editar este libro. Tuvieron ellos el acierto de obtener la colaboración de varios de los mejores expertos en el tema de Colombia, Ecuador, Argentina, Chile, Brasil, México, España, Francia, Israel y Estados Unidos, quienes en forma sucinta, elegante y altamente útil, presentan los últimos resultados de sus investigaciones y de su experiencia en la práctica clínica.

La revisión inicial de los mecanismos básicos de la defensa inmune resulta especialmente útil por cuanto permite al lector recordar o adquirir los conocimientos necesarios para una adecuada comprensión de los mecanismos fisiopatológicos responsables de cada una de las afecciones autoinmunes.

Es igualmente interesante la actualización en inmunogénetica, aspecto en el cual los avances se suceden con tal rapidez que resulta difícil para quien no trajina en un medio académico, estar al tanto de ellos y de sus aplicaciones.

Los autores, con gran experiencia en el manejo de las diferentes afecciones que tratan en sus respectivos capítulos, enseñan cómo diagnosticar mejor para poder tratar más oportunamente las distintas enfermedades autoinmunes.

La manera como esta obra presenta los conceptos básicos, incluyendo las técnicas más utilizadas en el laboratorio, coloca a los estudiosos de este texto, en condiciones de asimilar los nuevos avances y poder incorporarlos a su arsenal de trabajo clínico, terapéutico y de laboratorio.

William Rojas M., MD

AUTORES

Cecilia Alliende, BSc.
Investigadora Asociada, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Juan-Manuel Anaya C., MD.
Investigador Titular, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Alvaro Arango, MD.
Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Beatriz Aristizábal, MSc, PhD.
Coordinadora del Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, e Investigadora, Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Ronald A. Asherson, MD, PhD.
Jefe, Unidad de Enfermedades Reumáticas, Universidad de Cape Town, Cape Town, Sudáfrica.

Esperanza Ávalos D., MD, PhD.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores y de la Academia Nacional de Medicina, México. Profesor, Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

Julio Bai, MD.
Director del Departamento de Clínica Médica Hospital Municipal de Gastroenterología "Dr.Carlos Bonorino Udaondo", Buenos Aires, Argentina.

Boutahar Bendaoud, PharmD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Guillermo A. Berbotto, MD.
Hospital Escuela E. Perón, Granadero Baigorria, Reumatólogo, Sanatorio Británico de Rosario. Miembro de la Asociación de Reumatología de la Provincia de Santa Fe, Argentina.

Miri Blank, PhD.
Servicio de Medicina Interna "B" y Centro para Enfermedades Autoinmunes, Centro Médico Sheba, Tel-Hashomer, y Facultad de Medicina Sackler, Universidad de Tel-Aviv, Israel.

Mónica Brito, Bioquímico, PhD (estudiante).
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Jose F. Camargo, MD.
Research Fellow, Departamento de Medicina, Universidad de Texas, Centro de Salud, San Antonio Texas, EEUU.

Luz Elena Cano, PhD.
Investigadora Titular y Jefe, Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas; Profesora, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Carlos A. Cañas D., MD.
Jefe, Unidad de Reumatología, Fundación Clínica Valle del Lili, Coordinador del Postgrado de Medicina Interna CES-Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

Erika Caro, MSc.
Investigadora, Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

John Castiblanco, BSc, MSc (estudiante).
Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Ricard Cervera, MD, PhD.
Servicio de Enfermedades Autoinmunes, Instituto Clínico de Medicina y Dermatología, Hospital Clínico, Barcelona, Cataluña, España.

Alejandra C. Cherñavsky, PhD.
Investigadora Adjunta de CONICET. Universidad de Buenos Aires Hospital de Clínicas «José de San Martín», División de Inmunogenética, Buenos Aires, Argentina.

Paula A. Correa, MSc.
Investigadora Asociada, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, y Profesor Asistente, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Valérie Devauchelle, MD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Carlos Estrada, MD.
Médico Rural en Investigación, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, y Research Fellow, Departamento de Medicina, Universidad de Texas, Centro de Salud, San Antonio Texas, EEUU.

Valentin Florez G., MD.
Servicio de Inmunología y Alergología, ISSSTE, Puebla, México.

Joseph Font, MD, PhD.
Servicio de Enfermedades Autoinmunes, Instituto Clínico de Medicina y Dermatología, Hospital Clínico, Barcelona, Cataluña, España.

Claudio Galarza M., MD.
Unidad de Enfermedades Reumáticas y Autoinmunes (UNERA), Hospital Monte Sinai, Cuenca, Ecuador.

Edgar Garavito, MD.
Profesor de Inmunología, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Mario García-Carrasco, MD, PhD.
Profesor Titular de Inmunología, Facultad de Medicina, BUAP Puebla; Servicio de Reumatología, Hospital General No. 36 de SMN, Instituto Mexicano del Seguro Social "Manuel Ávila Camacho" Puebla, México.

Luis Miguel Gómez, MV, MSc (estudiante).
Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

José A. Gómez-Puerta, MD.
Servicio de Enfermedades Autoinmunes, Instituto Clínico de Medicina y Dermatología, Hospital Clínico, Barcelona, Cataluña, España.

Ángel González, MSc, PhD (estudiante).
Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

María-Julieta González, MSc.
Investigadora Titular, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Rafael Herrera E., MD, PhD.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores y de la Academia Nacional de Medicina, México. Profesor, Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

Sophie Hillion, BSc.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Christophe Jamin, PhD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Luís J. Jara, MD.
Jefe de la División de Investigación del Hospital de Especialidades «Antonio Fraga Mouret», Centro Médico La Raza. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Profesor de Posgrado de Reumatología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Fabio Jiménez, BSc.
Research Fellow, Departamento de Medicina, Universidad de Texas, Centro de Salud, San Antonio Texas, EEUU.

Diego F. Jiménez R., MD.
Unidad de transplantes de la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

Sandrine Jousse, MD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia

Yoon Jeoung Kwon.
Bioquímico. Investigadora Asociada, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Christelle Le Dantec, BSc.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Roger Abramino Levy, MD, PhD.
Profesor Adjunto de Reumatología, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad del Estado de Río de Janeiro, Brasil.

Aurelio López C., MD.
Coordinador de Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Puebla, México.

Javier Martín, MD, PhD.
Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra», Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, España.

Hernán G. Martínez, MD.
Research Fellow, Departamento de Medicina, Universidad de Texas, Centro de Salud, San Antonio Texas, EEUU.

Catalina Martínez I., MD.
Profesora Titular de Inmunología, Facultad de Medicina, BUAP, Puebla, México.

Paula Millán, MD.
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia.

Adriana Ordóñez V., MSc.
Facultad de Medicina, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Carolina Páez, MD, MSc (estudiante).
Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia.

Juan C. Pérez A., MD.
Servicio de Cardiología, Hospital General de SSA, Puebla, México.

Bernardo Pérez-Cuevas, MD.
Profesor Titular de Inmunología, Facultad de Medicina, BUAP Puebla, México.

Jacques-Olivier Pers, DDS, PhD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Ricardo Pineda-Tamayo, MD.
Coordinador, Unidad de Reumatología, Clínica Universitaria Bolivariana; Investigador, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Juan B. Pinzón B, MD, MSc.
Profesor Asistente de Medicina Interna, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia.

Bernardo A. Pons E., MD.
Coordinador del Grupo Latino-Americano de Estudio de Lupus (GLADEL), Coordinador del Grupo Latino-Americano de Artritis Reumatoide (GLADAR). Jefe del Servicio de Reumatología del Instituto Cardiovascular de Rosario. Investigador Adjunto, Departamento de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Docente Asociado de Reumatología, Hospital Provincial de Rosario, Argentina.

Marlon P. Quiñónes, MD.
Profesor Asistente, Departamento de Medicina, Universidad de Texas, Centro de Salud, San Antonio Texas, EEUU.

Yves Renaudineau, PharmD, PhD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Carlos Riebeling N., MD.
Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social D.F., México

Jorge Rojas S., MD.
Servicio de Reumatología, Hospital General del SSA, D.F., México.

Alejandro Ruiz-Argüelles, MD, PhD.
Director Médico, Laboratorios Clínicos de Puebla, Sistema Nacional de Investigadores, Academia Nacional de Medicina, Academia Mexicana de Ciencias, México.

Miguel A. Saavedra, MD.
Departamento de Reumatología, Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México.

Salvador Salinas S., MD.
Coordinación de Reumatología, Centro Médico Nacional Instituto Mexicano del Seguro Social "Manuel Ávila Camacho", Puebla, México

Alain Saraux, MD, PhD.
Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Norma C. Serrano D., MD, MSc.
Coordinadora Académica e Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia.

Yehuda Shoenfeld, MD.
Jefe, Servicio de Medicina Interna "B" y Centro para Enfermedades Autoinmunes, Centro Médico Sheba, Tel-Hashomer, y Facultad de Medicina Sackler, Universidad de Tel-Aviv, Israel.

Fernando Suárez O., MD.
Facultad de Medicina, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Gabriel Jaime Tobón G, MD.
Investigador, Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Carlos E. Toro G, MD.
Residente de Medicina Interna, Programa de Medicina Interna CES-Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

Gloria Vásquez, MD, DSc.
Docente-Investigadora, Grupo Reumatología y Grupo Inmunología Celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Patricia Vega, MD.
Unidad de Biología Celular e Inmunogenética, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Pierre Youinou, MD, PhD.
Profesor de Medicina y Jefe, Laboratorio de Inmunología, Hospital Universitario de Brest, Brest, Francia.

Soraya Zorro, MSc (estudiante).
Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín.

Luís Zurita G., MD.
Unidad de Enfermedades Reumáticas y Autoinmunes (UNERA), Hospital Kennedy, Guayaquil, Ecuador.

ÍNDICE DE MATERIAS

SECCION I. INTRODUCCIÓN A LA INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CAPÍTULO 1. Expresión y regulación génica 3
John Castiblanco, Alejandra C. Cherñavsky

CAPÍTULO 2. Respuesta inmune innata 21
Beatriz Aristizábal, Ángel González, Bernardo Pérez-Cuevas, Valentín Flórez G., Catalina Martínez I.

CAPÍTULO 3. Receptores tipo Toll 29
Soraya Zorro, Gloria Vásquez

CAPÍTULO 4. Complemento 37
Erika Caro

CAPÍTULO 5. Receptores Fcγ y autoinmunidad 49
Luis Miguel Gómez, Carlos A. Cañas D., Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 6. Respuesta inmune adquirida 57
Paula A. Correa

CAPÍTULO 7. Linfocitos B y T 71
Luz Elena Cano

CAPÍTULO 8. Linfocitos B, en la primera línea de autoinmunidad 83
Pierre Youinou, Christophe Jamin, Sophie Hillion, Sandrine Jousse, Alain Saraux, Jacques-Olivier Pers

CAPÍTULO 9. Linfocitos T en autoinmunidad 99
Alejandro Ruiz-Argüelles

CAPÍTULO 10. Coseñalización en autoinmunidad. Células T reguladoras, CTLA-4 y FOXP3 107
Luis Miguel Gómez, Javier Martín, Carlos A. Cañas D., Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 11. Citoquinas y quimioquinas 121
Hernán G. Martínez, Fabio Jiménez, Carlos Estrada, Juan- Manuel Anaya, Marlon P. Quiñónes

CAPÍTULO 12. MHC, procesamiento y presentación antigénica 133
Paula A. Correa, Luis M. Gómez, John Castiblanco, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 13. Endotelio: órgano blanco en las enfermedades autoinmunes sistémicas 147
Pierre Youinou, Christelle Le Dantec, Boutahar Bendaoud, Valérie Devauchelle, Yves Renaudineau, Christophe Jamin

CAPÍTULO 14. Hormonas, autoinmunidad y enfermedades autoinmunes 161
Luis J. Jara, Miguel A. Saavedra

CAPÍTULO 15. Apoptosis 171
Edgar Garavito

SECCION II. EL MOSAICO DE LA AUTOINMUNIDAD

CAPÍTULO 16. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. El mosaico de la autoinmunidad 183
Yehuda Shoenfeld, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 17. Introducción al estudio genético de las enfermedades autoinmunes 191
Norma C. Serrano, Paula A. Correa, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 18. Mecanismos moleculares de asociación del HLA con enfermedades autoinmunes 203
Paula A. Correa, Luis M. Gómez, John Castiblanco, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 19. Asociación no-HLA con enfermedades autoinmunes 211
Norma C. Serrano, Carolina Páez, Paula Millán, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 20. Autoinmunidad e infección 231
Ricard Cervera, José A. Gómez-Puerta, Miri Blank, Ronald A. Asherson, Yehuda Shoenfeld

CAPÍTULO 21. Cáncer y autoinmunidad 243
Yehuda Shoenfeld, Gabriel Jaime Tobón, Patricia Vega, Juan-Manuel Anaya

SECCION III. ENFERMEDADES AUTOINMUNES

CAPÍTULO 22. Lupus eritematoso sistémico 255
Juan-Manuel Anaya, Gabriel Jaime Tobón, Ricardo Pineda-Tamayo, Joseph Font, Ricard Cervera

CAPÍTULO 23. Síndrome antifosfolipídico

a. Síndrome antifosfolipídico 275
Mario García-Carrasco, Carlos Riebeling N., Salvador Salinas S., Juan C. Pérez A., Aurelio López C., Claudio Galarza M.

b. Síndrome antifosfolipídico y embarazo 287
Claudio Galarza M., Roger A. Levy, Mario García-Carrasco, Norma C. Serrano, Ricard Cervera

CAPÍTULO 24. Síndrome de Sjögren 295
Juan-Manuel Anaya, Patricia Vega, Paula A. Correa, Yoon J. Kwon, Mónica Brito, Cecilia Alliende, María-Julieta González

CAPÍTULO 25. Diabetes mellitus autoinmune 317
Gabriel Jaime Tobón, Alvaro Arango, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 26. Enfermedades autoinmunes tiroideas 331
Juan B. Pinzón B.

CAPÍTULO 27. Enfermedades autoinmunes hepáticas y digestivas

a. Hepatitis autoinmune 339
Alejandra C. Cherñavsky

b. Enfermedad celíaca 347
Alejandra C. Cherñavsky, Julio Bai

c. Cirrosis biliar primaria 353
Carlos A. Cañas D., Diego F. Jiménez R.

CAPÍTULO 28. Bases moleculares de las enfermedades autoinmunes del sistema nervioso 363
Luis Miguel Gómez, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 29. Enfermedades autoinmunes de la piel 373
Rafael Herrera E., Esperanza Ávalos D.

CAPÍTULO 30. Vasculitis sistémicas 385
Guillermo A. Berbotto, Bernardo A. Pons E.

CAPÍTULO 31. ¿Son las espondiloartropatías enfermedades autoinmunes? 399
Gabriel Jaime Tobón, Jose F. Camargo, Juan-Manuel Anaya

SECCION IV. TERAPÉUTICA

CAPÍTULO 32. Antiinflamatorios

a. Antiinflamatrorios no esteroideos 415
Ricardo Pineda-Tamayo

b. Glucocorticoides 423
Ricardo Pineda-Tamayo

CAPÍTULO 33. Terapia anti-TNF: bases moleculares y utilidad clínica 431
Claudio Galarza M., Ricardo Pineda-Tamayo, Luís Zurita G., Mario García-Carrasco, Jorge Rojas S., Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 34. Rituximab en enfermedades autoinmunes 441
Gabriel Jaime Tobón, Claudio Galarza M., Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 35. Otras terapias biológicas en enfermedades autoinmunes 453
Ricardo Pineda-Tamayo, Carlos E. Toro G., Carlos A. Cañas D.

CAPÍTULO 36. Terapia génica 467
Adriana Ordoñez V., Fernando Suárez O.

CAPÍTULO 37. Epigenética y terapia epigenética 479
Luis Miguel Gómez, Juan-Manuel Anaya

CAPÍTULO 38. Trasplante de células madre en enfermedades autoinmunes 489
Ricardo Pineda-Tamayo, Carlos E. Toro G., Carlos A. Cañas D.

SECCION V. PRINCIPIOS BASICOS DE LABORATORIO

CAPÍTULO 39. Preparación y análisis de DNA genómico 501
John Castiblanco, Paula A. Correa

CAPÍTULO 40. Separación y cultivo celular 505
John Castiblanco, Paula A. Correa

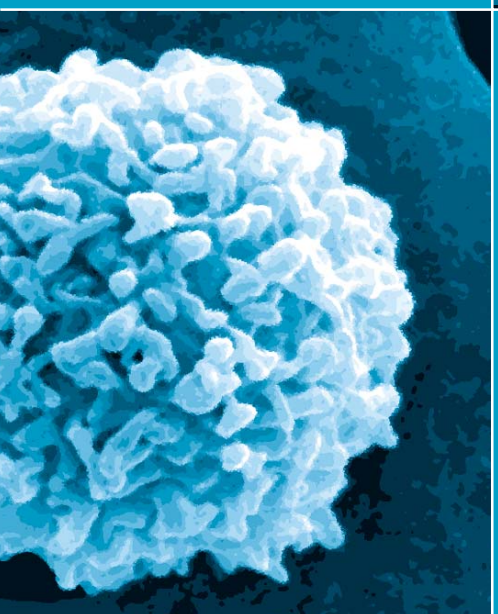
CAPÍTULO 41. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR 515
Paula A. Correa, John Castiblanco

CAPÍTULO 42. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time-PCR) y discriminación alélica 521
Paula A. Correa, John Castiblanco

CAPÍTULO 43. Secuenciación 529
Paula A. Correa, John Castiblanco

CAPÍTULO 44. ELISA 533
Paula A. Correa, John Castiblanco

SECCIÓN I



Introducción a la Inmunología y Biología Molecular

1

EXPRESIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA

John Castiblanco
Alejandra C. Cherñavsky

Contenido

Expresión génica en células humanas
- Del DNA a la proteína
- Los cromosomas y su empaquetamiento
- El concepto de GEN

Niveles de regulación de la expresión génica en células humanas
- Regulación a nivel celular
- Regulación a nivel subcelular

Los mecanismos de regulación de la expresión de genes humanos son los mismos que están presentes en la mayoría de los mamíferos. La regulación es más compleja pero equivalente a la que opera en organismos inferiores, siendo posible aplicar en ambos casos los mismos principios básicos. Como en otros eucariotas, la iniciación de la transcripción es el principal nivel en donde la expresión génica es controlada. Diversos niveles y mecanismos de regulación tanto espaciales como temporales son requeridos para mantener muchos de los estados de sincronía y disposición específica en la expresión génica de mamíferos en general. Este capítulo tratará los conceptos básicos de la expresión génica, para después describir los principales niveles y puntos de regulación.

Expresión génica en células humanas

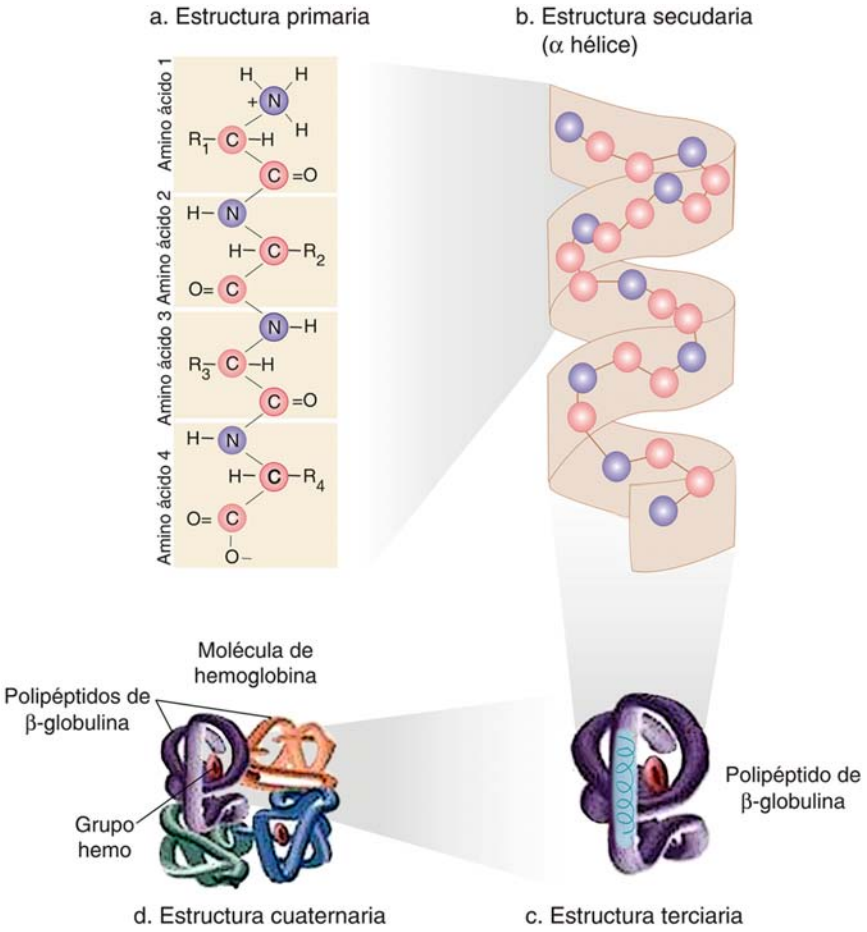
Del DNA a la proteína

Con la determinación de la estructura de DNA (ácido desoxirribonucléico) en la década de los 50, se estableció que el material genético almacena en el núcleo la información celular codificada por una secuencia de nucleótidos. El material genético es transmitido sin cambios, desde una célula progenitora hasta sus descendientes a través del proceso de replicación del DNA. La información genética es contenida en el DNA a expensas del uso de un alfabeto básico de cuatro letras (Adenina, Citosina, Guanina y Timina) que en combinaciones de a tres forman "codones" (Ej. ACG, etc.). El acoplamiento de eficientes maquinarias transcripcionales y traduccionales decodifican la información contenida en el DNA, y a través de moléculas intermediarias de ácido ribonucleico (RNA) permiten el flujo de la información desde el DNA hasta las moléculas de proteínas.

La colinearidad entre DNA y proteínas predice que el orden de los nucleótidos en el DNA especifica el orden de los aminoácidos en la proteína. Así, mutaciones en un gen se corresponderían con alteraciones en las proteínas. Yanofsky y colaboradores mapearon mutaciones en los genes que codifican para la síntesis del aminoácido triptofano, determinando una correlación entre alteraciones en aminoácidos y mutaciones en los respectivos genes.

Las propiedades de las proteínas están determinadas por el orden lineal de sus aminoácidos (secuencia o estructura primaria), en donde cada tipo de proteína tiene su propia y única secuencia de aminoácidos, que determina el plegamiento tridimensional que adoptará la molécula (estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) (Figura 1).

Cuando en la célula es necesaria la presencia de cierto tipo de proteína, la secuencia de nucleótidos de la región apropiada (Gen) es transcrita (copiada) a RNA (otro tipo de ácido nucléico). Estos transcritos de RNA (RNA mensajero, mRNA) son utilizados como moldes para dirigir la traducción y síntesis de la proteína específica. Por consiguiente, el flujo de información genética se produce en las células desde el DNA al RNA, para la obtención de proteínas. (Figura 2). Este principio fundamental biológico ha sido denominado el *dogma central de la biología*. En los años 70, el descubrimiento de virus tumorales cuyo genoma de RNA se convierte en genoma de DNA cuando se encuentra dentro de las células, cuestionó dicho dogma. El hallazgo de la enzima Transcriptasa Reversa, capaz de transformar en DNA la información contenida en moléculas de RNA constituyó una fuerte evidencia a favor de dicho cuestionamiento.



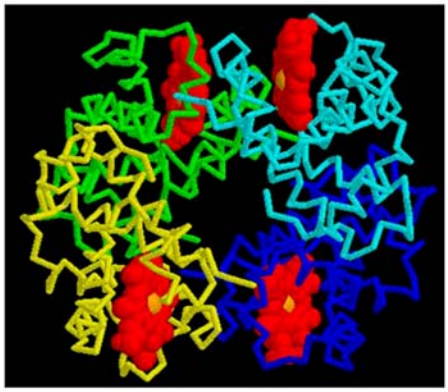


FIGURA 1.
Plegamiento tridimensional de la hemoglobina.
a. Estructura primaria, rearreglo linear, secuencia de aminoácidos. b. Estructura secundaria, plegamiento localizado en partes específicas de la proteína; formación de estructuras funcionales (α hélice y hojas β). c. Estructura terciaria, se refiere a la estructura completa de la cadena proteica y d. Estructura cuaternaria, describe el orden y la unión de las diferentes cadenas proteicas.

Conceptos esenciales en el flujo de información desde el DNA a las proteínas

- En todas las células el flujo de información genética (Figura 2) es: DNA–RNA–PROTEÍNA. La conversión del DNA en RNA a proteínas se denomina *expresión génica*.
- Para expresar la información genética contenida en el DNA, en primer lugar la secuencia de nucleótidos de un gen es transcripta a RNA. Esta transcripción es catalizada por la RNA polimerasa; secuencias de nucleótidos específicos de la molécula de DNA indican a la RNA polimerasa dónde comenzar y terminar la transcripción.
- El RNA se diferencia del DNA en contener el azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa, y la base uracilo (U) en lugar de timina (T). Los RNA en la célula son sintetizados como moléculas de cadena sencilla, que a menudo se pliegan formando estructuras tridimensionales precisas.
- Los principales tipos de RNA son: RNA mensajero (mRNA), el cual contiene las instrucciones para generar proteínas; RNA ribosomal (rRNA), el cual es un componente de los ribosomas y RNA de transferencia (tRNA) que actúa como molécula adaptadora en la síntesis de proteínas. Otras especies menos abundantes intervienen en procesos catalíticos específicos (Ej. RNAs nucleares cortos (snRNA) en la maduración de mRNA).
- En eucariotas, los genes poseen secuencias codificantes o exones y secuencias intercaladas entre los exones que no poseen información o intrones. La transcripción de genes eucariotas origina transcriptos primarios que incluyen secuencias exónicas e intrónicas (Figura 2b).
- En el núcleo, los intrones son eliminados del transcripto primario a través del proceso de maduración del RNA eliminación de intrones y empalme de exones o "splicing" (Figura 3), éste es modificado en sus extremos 3´ y 5´ ("capping" y "poliadenilación") (Figura 10).
- La traducción se realiza en el citoplasma. Participan grandes complejos ribonucleoproteicos denominados ribosomas que se unen al mRNA y se desplazan en dirección 5´- 3´ para sintetizar proteínas en dirección NH_2-COOH.
- La correspondencia entre aminoácidos y codones está especificada por el código genético universal. Las posibles combinaciones de cuatro nucleótidos diferentes en el RNA producen 64 codones. La mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón.
- Los tRNA actúan en la síntesis de proteínas como moléculas adaptadoras. Las enzimas denominadas aminoacil – tRNA sintetasas unen cada aminoácido a su tRNA apropiado. Cada tRNA contiene una secuencia de tres nucleótidos, el anticodón, que por acoplamiento complementario de bases, se corresponde con un codón del mRNA.
- La síntesis de proteínas se inicia cuando un ribosoma se ensambla en un codón de iniciación (AUG) del mRNA, proceso que está regulado por proteínas denominadas factores de iniciación. Cuando se alcanza un codón de parada (UAA, UAG o UGA), la cadena completa proteica se libera del ribosoma.

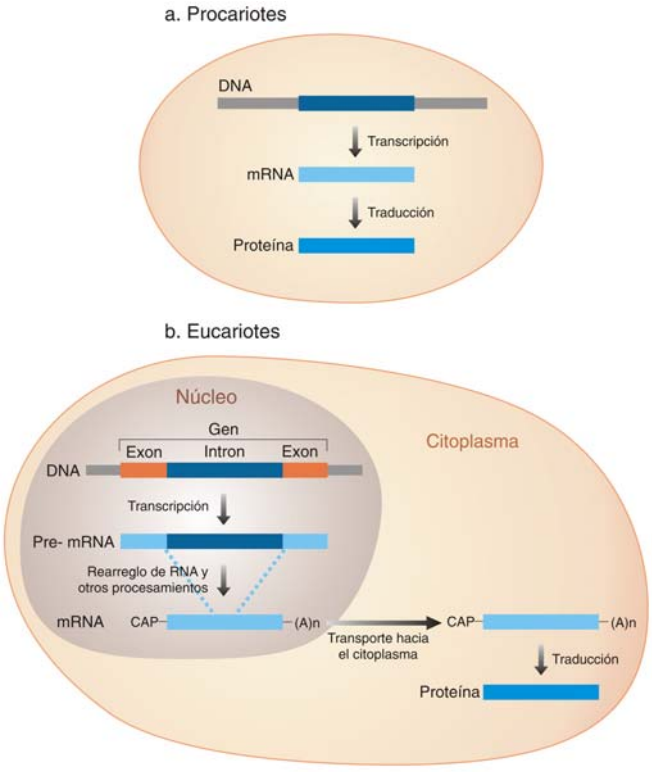


FIGURA 2.
Flujo de la información genética; del gen a la proteína.
a. Procariotes. b. Eucariotes. La cantidad de proteína final depende de la eficiencia de cada una de las etapas y de la compensación en la degradación del RNA y de la proteína.

Los cromosomas y su empaquetamiento

Se requiere una gran cantidad de DNA para codificar la información necesaria para producir desde una bacteria sencilla hasta un organismo pluricelular con todas las instrucciones necesarias para su desarrollo. Esto requiere que el DNA pueda plegarse y empaquetarse en forma compacta tanto en el citoplasma de los organismos procariotas como en el núcleo de las células eucariotas. En las células procariotas la molécula de doble cadena de DNA se dispone como un único cromosoma circular. En las células eucariotas, las moléculas de DNA se empaquetan en cromosomas discretos mediante la asociación con proteínas especializadas, y en cada división celular éstos se duplican y luego se segregan entre las dos células hijas. El empaquetamiento se ha de realizar de manera ordenada de forma que, los genes contenidos en las moléculas de DNA queden accesibles para poder ser replicados o transcritos (Figura 4).

El diámetro nuclear aproximado de una célula humana es 5 - 8 μm (micrometros, 10^{-6} metros) y contiene alrededor de dos metros de DNA. El complejo de DNA y proteínas se designa cromatina (der. griego. *chroma*, coloreado). Los nucleosomas son las unidades básicas de la estructura de la cromatina. Cuando los cromosomas se preparan para entrar en mitosis, adoptan una estructura cada vez más compacta hasta que se forma el cromosoma

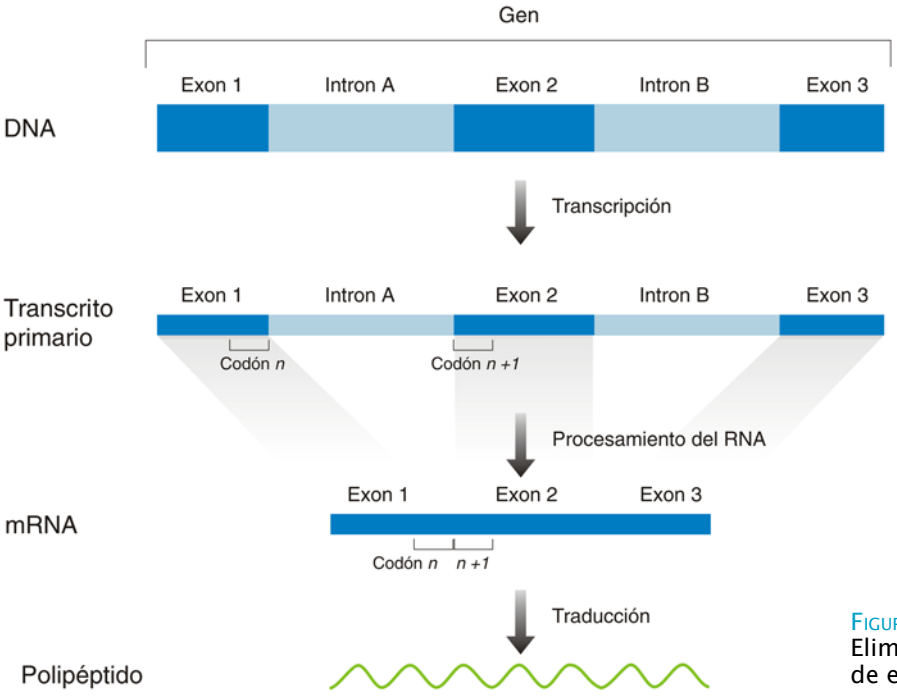


FIGURA 3.
Eliminación de intrones y empalme de exones o "splicing".

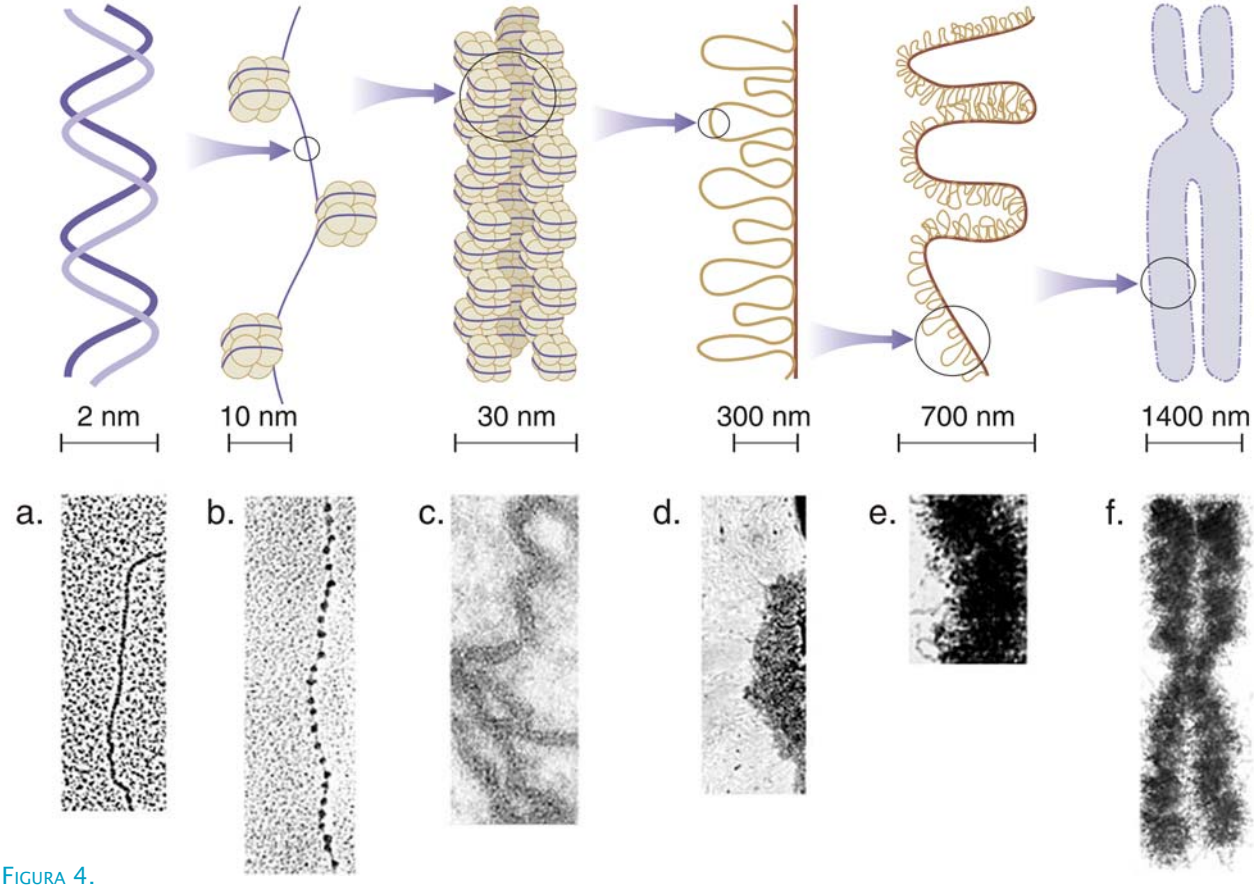


FIGURA 4.
Compactación cromosómica.
a. Molécula de DNA. b. Nucleosomas. c. Solenoide.
d. Esqueleto. e. y f. Formación de la estructura cromosómica (ver texto).

mitótico. Cada nucleosoma está constituido por un complejo de ocho proteínas histonas (dos monómeros de cada histona H2A, H2B, H3 y H4) y un DNA de doble cadena de aproximadamente 146 pares de nucleótidos. El octámero de histonas forma un núcleo de proteínas alrededor del cual se enrolla el DNA de doble cadena (Figura 5).

Los nucleosomas al mismo tiempo son capaces de plegarse unos sobre otros generando una estructura más compacta (solenoide); este empaquetamiento depende de la histona H1. Más allá de la formación del solenoide esta estructura es capaz de compactarse aún más, plegándose y formando un esqueleto para luego empaquetarse una vez más para formar la estructura del cromosoma (Figura 4).

Numerosos estudios bioquímicos y genéticos indican que la cromatina está, además, involucrada en la regulación de la expresión génica. La distribución y/o estructura de los nucleosomas es alterada a nivel de los elementos de control transcripcional antes o junto con la activación transcripcional, proceso en el que participan complejos multiproteicos, tales como los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, complejos de transferencia de acetilos o complejos desacetilantes de histonas. Las diferentes alteraciones de la cromatina permiten regular la interacción entre el DNA y las proteínas involucradas en el control transcripcional.

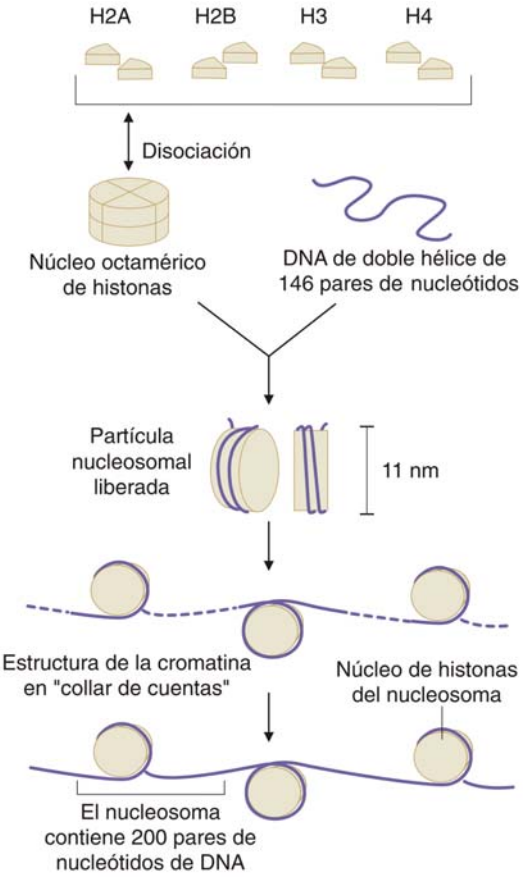


FIGURA 5.
Naturaleza del nucleosoma.
Cada nucleosoma está formado por cuatro dímeros de histonas (H2A, H2B, H3, H4) (ver texto).

El concepto de GEN

Varios aspectos genéticos y mecanísticos distinguen los procesos de síntesis de RNA en eucariotas y procariotas**.** El gen ha sido originalmente definido como una entidad que codifica para un RNA monocistrónico (transcrito) que dirige la síntesis de un producto polipeptídico. En los años 50, los trabajos de Jacob y Monod establecieron claramente que en bacterias existe un control coordinado en la expresión de genes pertenecientes a una misma ruta metabólica**.** Surge así el concepto de varios productos codificados por una unidad transcripcional individual (segmento de DNA que es transcrito a RNA), reconocido ampliamente en genomas simples. Dichos transcritos multigénicos, son procesados para generar dos o más polipéptidos diferentes. En este caso el término funcional de "unidad transcripcional" no equivale al concepto estructural original de gen, pues cada unidad transcripcional corresponde a varios genes. En genomas complejos (humano y otros mamíferos), la gran mayoría de los genes son transcritos en forma individual.

La maquinaria celular cuenta con una multiplicidad de mecanismos de reestructuración genética y control de la expresión del DNA, en algunos casos específicos para ciertos tipos celulares, que serán referidos a continuación.

Niveles de regulación de la expresión génica en células humanas

Regulación a nivel celular

Como se mencionará seguidamente, la expresión génica puede ser alterada de forma semipermanente a medida que las células se diferencian. A su vez, la expresión génica también puede ser alterada reversiblemente en respuesta a estímulos extracelulares. Estímulos ambientales que afecten las concentraciones celulares de ciertos iones, presencia de trazas de nutrientes, temperatura, etc., pueden dar como resultado una dramática alteración de los patrones de expresión génica en las células expuestas a dichos cambios.

En los organismos multicelulares complejos se presenta una necesidad de comunicación entre las células. Debido a lo anterior, se evidencian diferentes formas de señalización (Tabla 1).

Regulación a nivel subcelular

Los mecanismos subcelulares de regulación de la expresión de genes humanos son los mismos que se encuentran presentes en la mayoría de los mamíferos. La regulación es más compleja pero equivalente a la que opera en organismos inferiores, siendo posible aplicar en ambos casos los mismos principios básicos. Como en otros eucariotas, la iniciación de la transcripción es el principal nivel en donde la expresión génica es controlada. Diversos mecanismos de regulación tanto a nivel espacial como temporal son requeridos para mantener muchos de los estados de sincronía y disposición específica en la expresión génica de mamíferos en general.

TABLA 1. Diferentes formas de señalización en organismos multicelulares.

Tipo de señalización	Características
De célula a célula	Una señal específica producida por una célula se une al receptor específico de otra. Ej. factor de crecimiento epitelial producido por células mesenquimales con efectos sobre células epiteliales.
Endocrina	Las hormonas son secretadas por células endocrinas especializadas y éstas recirculan para alcanzar sus células blanco en sitios distantes del organismo. Ej. hormonas tiroideas.
Paracrina	Una molécula que al ser liberada de una célula actúa a nivel local para afectar célula vecinas. Ej. Interferones.
Autocrina	Una célula que produce una molécula que a su vez tiene efectos sobre la célula productora. Ej. Interleuquina 2 (IL-2) sobre los linfocitos T activados.

CAJA 1. Restricción de la expresión génica a nivel temporal y espacial.

Restricción espacial de la expresión génica

En organismos pluricelulares, algunos genes requieren estar expresados en todos los tipos celulares. Éstos codifican para funciones celulares tales como productos de vías metabólicas esenciales o proteínas del citoesqueleto celular son llamados genes constitutivos. Sin embargo, la mayor parte de los genes humanos y de mamíferos en general presentan patrones de expresión tejido específicos. Los diferentes niveles de restricción espacio – temporal se pueden describir de la siguiente manera:

Nivel	Características
Patrón múltiple órgano / tejido	Se conocen diferentes tipos de expresión multisistémica. En muchos casos un mismo gen puede llevar a cabo una función similar en diferentes tipos de órganos. En otros casos, un gen puede disponer de varias isoformas, tejido u órgano específicas. Ej. Receptor de adrenalina.
Linaje celular o tejido específico	Expresión de un gen específico con una función celular propia de un tipo celular particular. Ej. CD45, marcador celular panleucocitario.
Células individuales	Alguno genes producen productos diferentes en células individuales pertenecientes al mismo linaje o tipo celular. Ej. Impronta genética.
Distribución intracelular	Las proteínas de diferentes genes son transportadas a distintos compartimientos intracelulares. Ej. Diferentes isoformas de acetiltransferasa, peroxisomal y mitocondrial.

Restricción temporal de la expresión génica

Nivel	Características
Fase del desarrollo	En las etapas tempranas del desarrollo no ocurre transcripción, en cambio las células dependen de RNA sintetizado previamente. Existen algunas familias génicas en las cuales algunos genes son expresados transitoriamente durante etapas específicas del desarrollo. Ej: embriogénesis en *Drosophila.*
Fase de diferenciación	A medida que las células se diferencian, sus genomas son modificados dando como resultado patrones de expresión alterados. Ej: inmunoglobulinas de membrana o de secreción.
Fase de ciclo celular	Algunos genes son solamente expresados en momentos específicos del ciclo celular. Ej: ciclinas.
Expresión inducible	Algunos genes son activados en respuesta a algún estímulo ambiental. Ej: proteínas de choque térmico.

Las células disponen de por lo menos seis puntos de control para la producción de sus proteínas. A modo de simplificación es conveniente agruparlos en tres niveles (I, II y III) (Figura 6) (Caja 1).

I. Regulación transcripcional

1. Control transcripcional

El control transcripcional se ejerce a nivel de promotores de los genes blanco. Los niveles basales de transcripción pueden ser modulados por la unión de factores transcripcionales (FT, "*Transcription Factors* (TF)") a secuencias de DNA reguladoras que limiten o se encuentren en el interior del gen blanco, de esta forma, promueven un eficiente reclutamiento de la RNA polimerasa (RNApol).

Factores transcripcionales de acción –*trans* y elementos reguladores de acción –*cis*.

Los FT incluyendo elementos de activación o represión transcripcional son proteínas primordiales que una vez sintetizadas y procesadas en el compartimiento cito-

plasmático deben migrar al núcleo y actuar a nivel de los sitios específicos de unión al DNA, por lo que se les denomina factores reguladores de acción – *trans*.

Por otra parte, las secuencias reguladoras localizadas sobre el mismo cromosoma en que se encuentra el gen blanco o sobre la misma molécula en el caso del RNA se denominan elementos de acción – *cis* (Caja 2) (Figura 7).

Control de la expresión por proteínas de unión al DNA

El principal control de expresión en eucariotas se ejerce a nivel de la *iniciación de la transcripción* y una de las piezas clave de regulación a este nivel es la enzima RNA polimerasa (RNApol). Se conocen tres tipos de polimerasas y son complejos multiproteicos que constan de 8 - 14 subunidades polipeptídicas con cerca de 500 kDa (KiloDaltons). Se encuentran localizadas en el núcleo y cada una está involucrada en la transcripción de diferentes tipos de genes (Tabla 2). Las polimerasas son incorporadas al promotor del gen blanco para iniciar su transcripción, previa unión de los FT sobre dicho promotor. Debido a que la cromatina se encuentra altamente organizada y empaquetada en una estructura densa impidiendo el acceso de la RNApol, son requeridos los FT para activar y promover una estructura que favorezca la transcripción. El complejo de la RNApol, los FT y el promotor del gen blanco se conoce como "aparato basal de transcripción" que constituye el complejo supramolecular mínimo requerido para el inicio de la transcripción (Figura 8).

Los genes constitutivos son expresados a una razón mínima, a no ser que sea aumentada o disipada su expresión por factores reguladores positivos o negativos. La expresión de un alto porcentaje de los genes transcritos por la RNApol tipo II está sujeta a regulación tejido- específica.

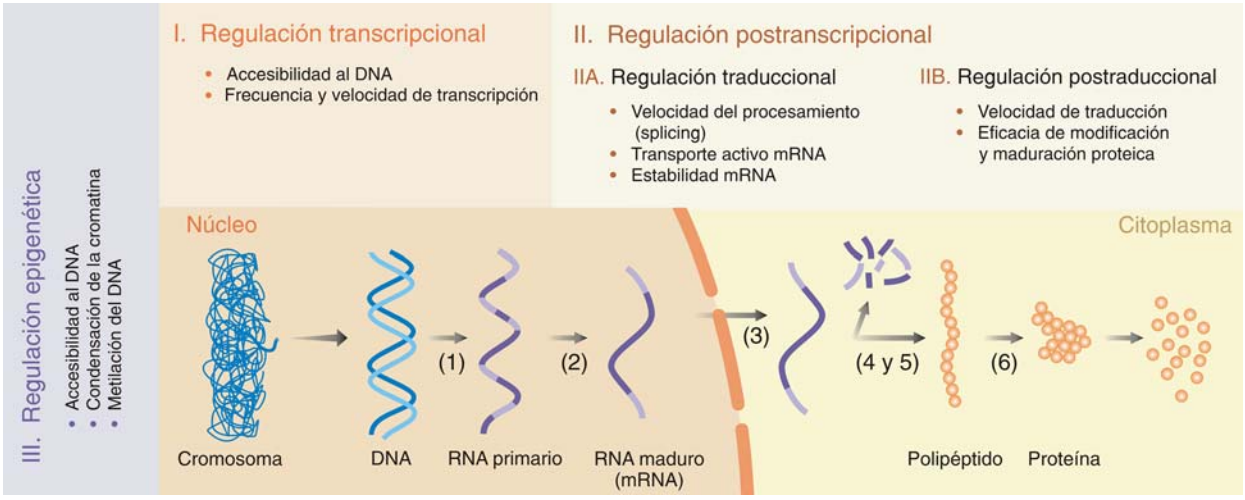


FIGURA 6.
Tres niveles diferentes de regulación y puntos de control en la expresión génica.
I. Regulación transcripcional. II. Regulación postranscripcional. III. Regulación epigenética. Puntos de control: 1. Control ranscripcional (se ejerce principalmente sobre el *inicio* de la transcripción). 2. Control de procesamiento de los transcritos (requiere proteínas de unión al RNA). 3. Control del transporte de transcritos al citoplasma. 4. Control de la traducción del transcrito. 5. Control de la degradación del transcrito. 6. Degradación de la proteína.

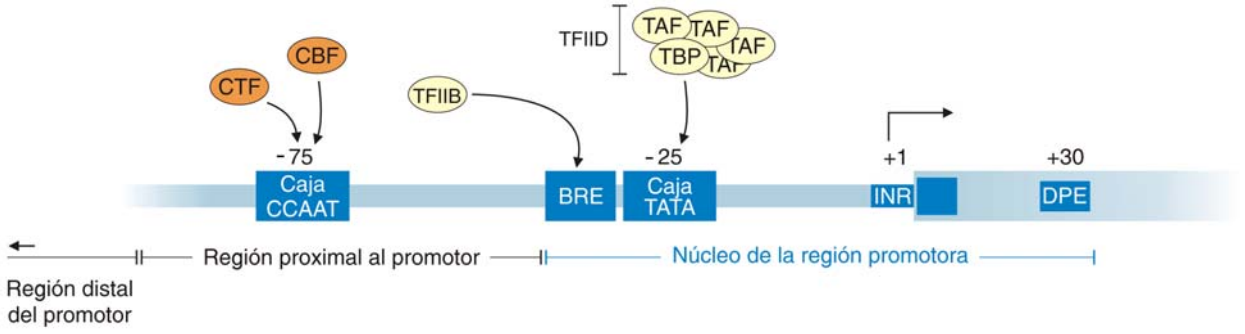


FIGURA 7.
Localización de elementos reguladores en eucariotes unidos por factores de transcripción ubicuos.
No todos los elementos de regulación deben estar presentes en el promotor. Muchos genes que no poseen cajas TATA usan el análogo funcional INR. Las cajas GC se encuentran usualmente en los promotores pero su localización es variable. Abreviaturas: INR, elemento iniciador; BRE, elemento de reconocimiento de TFIIB; DPE, elemento promotor localizado corriente abajo; CTF, factor de transcripción de unión a secuencias CCAAT; CBF, factor de unión a cajas CCAAT; TBP, proteína de unión a cajas TATA; TAF, factores asociados a TBP. (ver Caja 2)

Tabla 2. RNA polimerasas en eucariotas.

Tipo	Genes transcritos	Comentarios
I	28S rRNA; 18S rRNA; 5.8S rRNA	Transcribe genes de expresión constitutiva. Iniciación de la transcripción por la unión de dos factores de transcripción de acción – *trans* UBF y SL1. Un solo transcrito primario (45kb) es clivado para dar origen a las tres clases de RNA.
II	Genes que codifican proteínas	Los transcriptos de esta polimerasa son los únicos que sufren procesos de poliadenilación y "capping". Dependiente de factores de transcripción de acción – *trans* (TF Transcription Factors). TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIID, etc.
III	5S rRNA; genes tRNA, U6 snRNA; 7SL RNA	Transcribe genes de expresión constitutiva. El promotor de dichos genes puede encontrarse dentro de la secuencia del gen blanco o corriente arriba del sitio de iniciación.

Abreviaturas: rRNA (RNA ribosomal); tRNA (RNA de transferencia); snRNA (RNA nuclear corto).

Caja 2. Elementos de acción *cis* involucrados en la regulación de la transcripción

Los promotores son combinaciones de elementos de secuencias de nucleótidos cortas, usualmente localizadas corriente arriba de los genes y sirven para dar inicio a la transcripción. Éstos pueden ser subdivididos en varios componentes:

El núcleo del promotor

Contiene componentes que dirigen la transcripción basal. Los componentes de este núcleo generalmente se encuentran localizados muy cerca del sitio de inicio de la transcripción e incluyen elementos tales como: 1) cajas TATA (TATA(A/T)A(A/T) rodeada por secuencias GC y reconocida por el TFID; 2) secuencias BRE (TFIIB Recognition element, elementos de reconocimiento para TFIIB), localizado inmediatamente corriente arriba de la caja TATA y reconocido por el TFIIB. 3) el Inr (iniciador), secuencia localizada en el sitio de inicio de la transcripción. 4) DPE (Elemento promotor corriente abajo, Dowstream Promoter Element).

Elementos adicionales

Normalmente localizados corriente arriba de las secuencias del núcleo del promotor, incluye sitios típicos de reconocimiento para factores de transcripción ubicuos: 1) Cajas GC ((Caja Sp1) afinidad por el factor de transcripción Sp1). 2) Caja CCAAT, reconoce los factores CFT y CBF; las dos cajas actúan como moduladoras de la transcripción basal y operan como potenciadores.

Potenciadores

Elementos de regulación positiva que incrementan la transcripción basal.

Silenciadores

Reducen los niveles de transcripción.

Aisladores

Bloquean la influencia de otros elementos que poseen capacidad positiva de regulación.

Elementos de respuesta

Modulan la transcripción en respuesta a un estímulo externo.

Dado que el DNA es esencialmente idéntico en la mayoría de las células diploides nucleadas de un individuo, la identidad celular específica es definida por las proteínas que ésta produzca. En consecuencia, adicionalmente a los FT ubicuos, FT específicos y restringidos a tejidos regulan la expresión de los genes mediante el reconocimiento de secuencias específicas de elementos de acción (Caja 2). Debido en parte al tamaño del genoma nuclear en mamíferos y a la necesidad de disponer de sistemas de control sofisticados que regulen la interacción de un gran número de genes, los elementos de control en eucariotas deben ser muy elaborados.

A menudo, la regulación de la expresión de genes humanos es controlada por varios grupos de elementos de acción *-cis*. Estos elementos individuales reguladores pueden estar compuestos por múltiples elementos de secuencia corta (4-8 nt (nucleótidos)) y esparcidos a lo largo de varios cientos de pares de bases.

La expresión génica en tejidos específicos y en fases del desarrollo específicas a menudo se confiere por potenciadores (*enhancers*), silenciadores y una gran variedad de secuencias de acción *–cis* que son reconocidas por factores de transcripción tejido específicos.

Motivos estructurales específicos para unión al DNA de factores de transcripción de acción *–trans*

Los factores de transcripción reconocen y se unen a secuencias cortas y específicas de DNA, como consecuencia de una extensa complementariedad entre la superficie de la proteína y la secuencia reconocida**.** Aunque las interacciones entre las dos entidades usualmente son débiles, la región de interacción es generalmente caracterizada por 20 puntos de contacto**,** que colectivamente aseguran la estabilidad y especificidad de dicha unión**.**

Los factores de transcripción eucariotas presentan un dominio de activación y un dominio de unión al DNA. Se especula que estos dominios regulan la transcripción a tra-

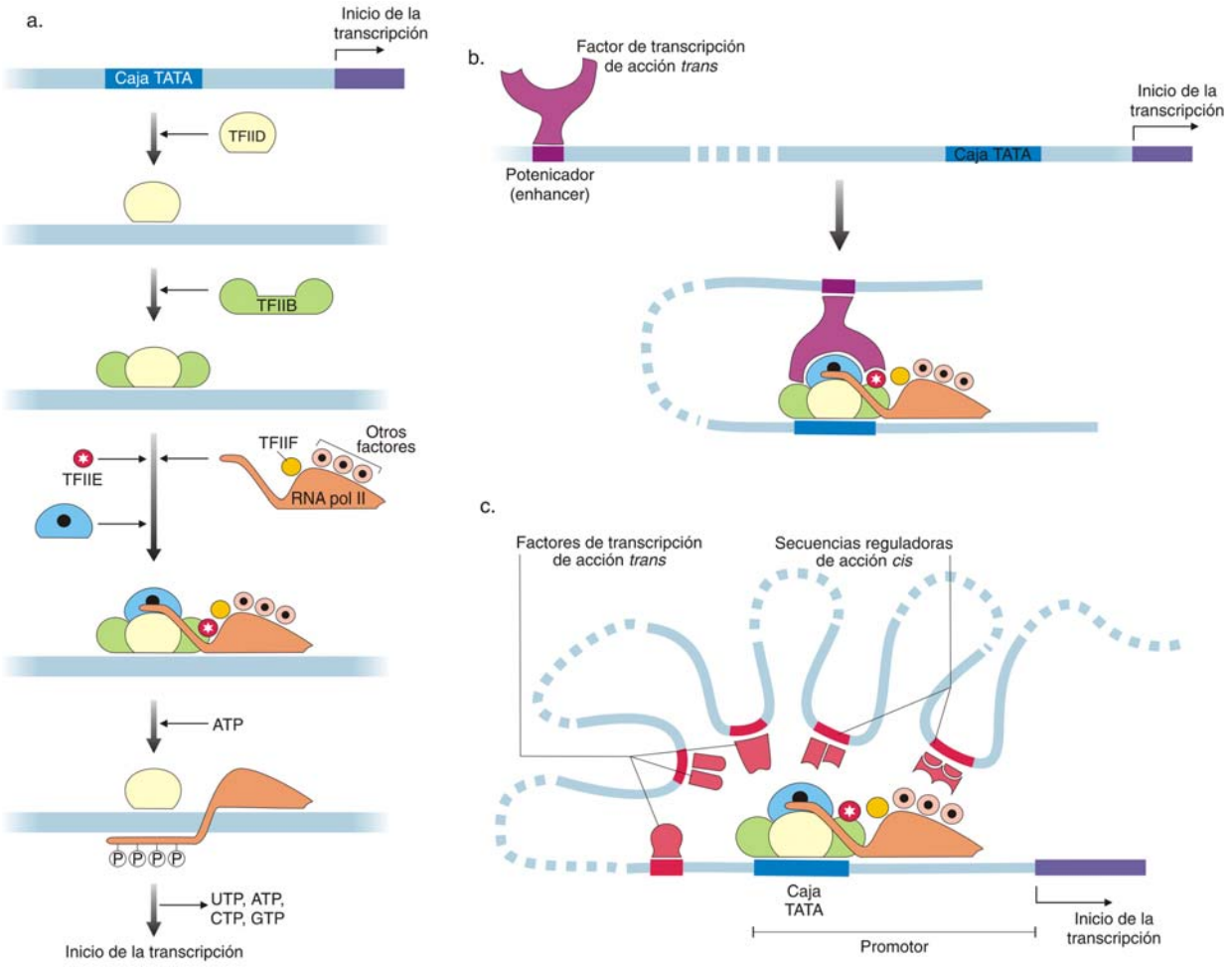


FIGURA 8.
RNA polimerasa y factores de transcripción de acción – *trans*.
a. Iniciación de la transcripción en eucariotas por la RNA polimerasa II (RNApol). Para poder iniciar la transcripción se requiere de una serie de factores de transcripción ubicuos (TFIIA, TFIIB, etc.). Estos factores se ensamblan en el promotor junto con la RNApol II. Así, el factor TFIIH, fosforila la RNApol cambiando la conformación y haciendo que sea liberada del complejo para iniciar la transcripción. b. y c. El papel esencial de los factores de transcripción es permitir que se forme el aparato basal transcripcional, permitiendo que se doble la cadena de DNA para favorecer la interacción entre los elemento de acción – *cis* del gen.

CAJA 3. Factores de transcripción y su asociación con autoinmunidad

En la actualidad se propone que las enfermedades autoinmunes poseen un perfil genético común para diversas enfermedades. Datos genéticos de estudios de asociación han descrito y reportado genes relacionados con susceptibilidad y/o resistencia a desarrollar ciertas patologías autoinmunes. A continuación se describirá muy brevemente reportes en los cuales se asocia una familia de factores de trascripción de dominio runt (RUNX) con una familia de factores de transcripción de acción – *trans*.

En tres desordenes autoinmunes que presentan manifestaciones clinicas diferentes (Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Psoriasis y Artritis Reumatoide (AR)) han sido identificados independientemente polimorfismos moleculares (rSNP, polimorfismos reguladores de nucleótido simple) asociados con susceptibilidad a adquirir cada patología. Helms y sus colaboradores, en el locus *PSORS2*, reportaron 5 polimorfismos asociados con psoriasis, análisis posteriores demostraron que uno de estos polimorfismos se hallaba afectando un sitio de unión para RUNX1, posiblemente regulando la expresión de los genes *SLC9A3R1* y *NAT9*. Tokuhiro y colaboradores reportaron una alta asociación para AR en polimorfismos que afectan elementos reguladores en sitios de unión para RUNX1 en el cromosoma 5p31. Prokunina y colaboradores determinaron la asociación de un polimorfismo en un sitio de unión también para RUNX1, en el gen PDCD1, localizado en un potenciador intrónico, sugiriendo un papel central en la regulación y contribucion al desarrollo de LES en humanos.

Estos hallazgos sugieren la participación de estos factores de unión al DNA en autoinmunidad. Adicionalmente, las proteínas de dominios runt son conocidas por ser activadores y represores transcripcionales; muchas de las moléculas codificadas blanco de regulación por moléculas RUNX tienen un papel relevante en autoinmunidad y muchas pueden estar involucradas en la destrucción de cartílago y en la hiperproliferación de la piel. No es claro a que nivel de regulación se encuentran los RUNX en autoinmunidad, pero algunas posibilidades incluyen la hematopoyesis y la diferenciación de linfocitos T. Es necesario que se verifique mejor la relación y el papel en la regulación génica de estos factores y los genes que regula.

vés de su interacción con los componentes del complejo mínimo de transcripción basal. Los dominios de unión al DNA, son necesarios para permitir la interacción física del factor con la molécula de DNA. Estos factores han sido ávidamente estudiados y presentan motivos estructurales comunes que incluyen: las cremalleras de leucina, los dedos de zinc y los homeodominios (Figura 9).

II. Regulación postranscripcional

2. Control de procesamiento de los transcritos

Eliminación de intrones y empalme de exones o *"splicing"* alternativo

Alelos individuales de un mismo gen son capaces de generar gran variedad de productos génicos (isoformas). Un alto porcentaje de los genes humanos sufre *"splicing"* alternativo de sus exones, en donde diferentes combinaciones de sus exones son incluidas en diferentes transcriptos del mismo gen durante el procesamiento del RNA. Para muchos genes, numerosas isoformas pueden ser generadas a nivel del RNA, pero a menudo su significado funcional es poco apreciado.

El *"splicing"* alternativo de secuencias exónicas codificantes es un proceso frecuente y algunas de las isoformas proteicas obtenidas son de expresión tejido específica (Figura 10). En el caso de la síntesis de inmunoglobulinas, el proceso de *"splicing"* alternativo de exones es el responsable de la síntesis simultánea de cadenas pesadas μ ó δ de membrana (μm o δm).

Los mecanismos de "splicing" involucran la interacción específica de proteínas y snRNA con las moléculas de mRNA para su procesamiento diferencial. Estos mecanismos representan una importante fuente de variabilidad que ilustra la intrincada complejidad que se establece para decodificar genes individuales.

Como se mencionó anteriormente, además del procesamiento del RNA, la regulación postranscripcional incluye otros niveles de control de la expresión como el transporte del mRNA, traducción y estabilidad del mRNA.

Poliadenilación alternativa

El uso de señales de poliadenilación alternativa es frecuente en humanos, diferentes tipos han sido identificados (Edwards y Gilbert, 1997). En muchos genes, dos o más señales de poliadenilación se encuentran en el extremo 3' UTR y cada uno de estos transcritos puede ser tejido específico; en otros casos, las señales de poliadelinación suelen ser usadas luego del *"splicing"* alternativo. La poliadenilación alternativa es responsable de la síntesis de cadenas pesadas μ de membrana o de secreción, proceso sometido a regulación temporal durante la diferenciación de los linfocitos B.

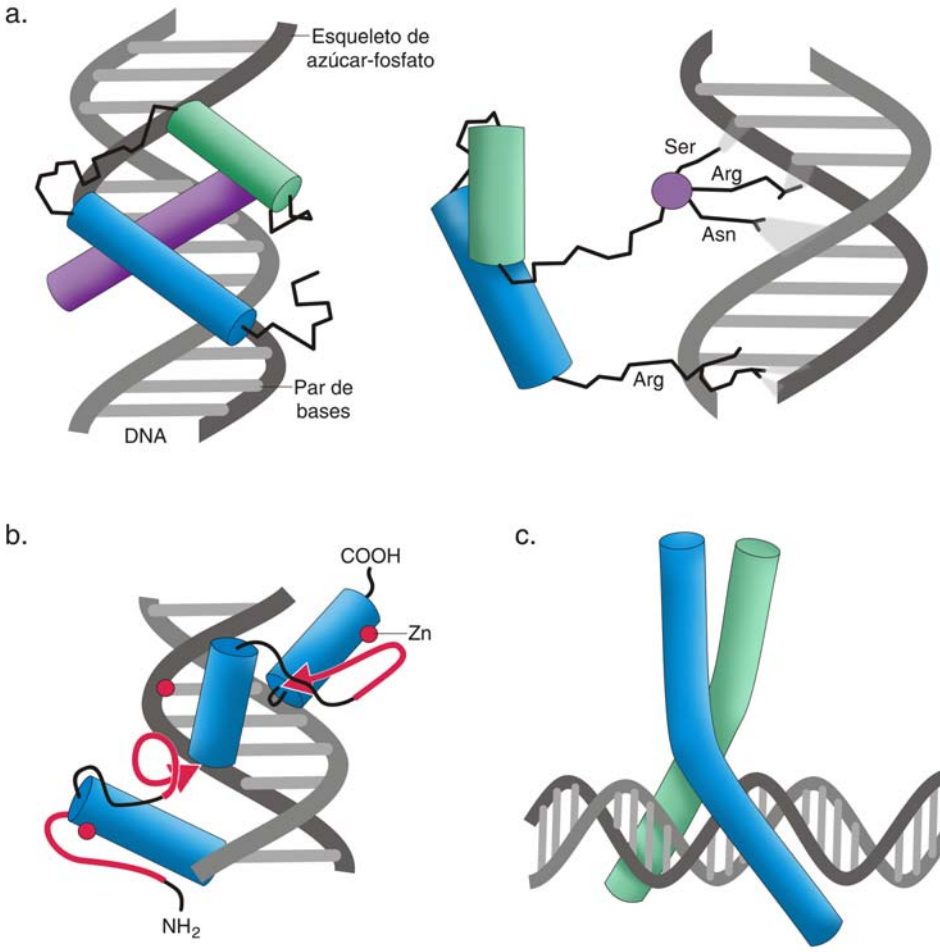


Figura 9.
Motivos estructurales comunes de unión con el DNA.
a. Homeodominios: Vista frontal y lateral, conformado por tres hélices α unidas, que se observan como cilindros.
b. Dedo de zinc: conformado por una lámina alfa y una beta que se mantienen unidas entre sí por una molécula de zinc. Con frecuencia se encuentran en grupos unidos de subunidades. En la ilustración se muestran tres moléculas.
c. Cremallera de leucina, formada por dos hélices alfa, cada una de las cuales se origina de una molécula de proteína.

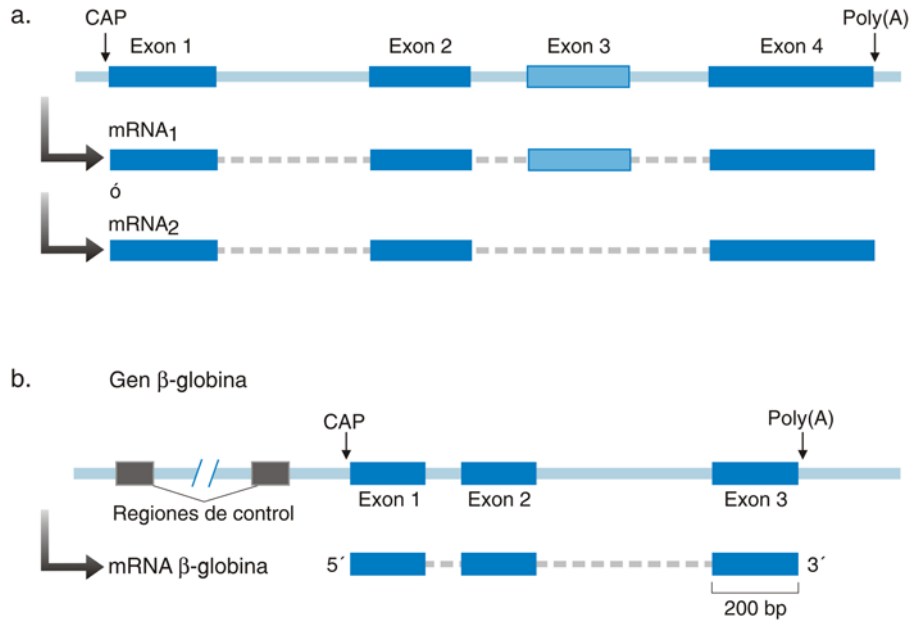


Figura 10.
"Splicing" alternativo.
a. Isoformas posibles de un gen hipotético de cuatro exones.
b. Estructura del gen de la β-globina.

Edición del RNA

El término edición de RNA describe otro tipo de procesamiento de transcritos primarios para obtener moléculas de mRNA apropiadas para su traducción en proteínas funcionales (Figura 11). La edición de RNA involucra la sustitución (inserción o deleción) de nucleótidos, por medios enzimáticos. La edición puede provocar codones de iniciación, de parada y marcos de lectura continuos (ORFs [Open Reading Frames]) y eventualmente, ocurrir dentro de la región 5' ó 3' UTR y la región poly A de varios transcritos pero no afectar todas las regiones al mismo tiempo.

Se han descrito cambios de nucleótidos específicos en tRNA mitocondrial de *Acanthomoeba castellani* (Lonergan y Gray, 1993) y en marsupiales (Janke y Pavo, 1993); inserciones de C en múltiples transcritos mitocondriales de *Physarum polycephalum* (Mahendran et al, 1991); cambios a nivel del mRNA de U a C en el gen supresor del tumor de Wilm (Shalma et al, 1994) y una sustitución específica de A a G en el mRNA del receptor del glutamato en mamíferos (Sommer et al, 1991; Cha et al, 1994; Egebjerg et al, 1994; Puchalski et al, 1994). Se encontró que muchas de estas modificaciones son reguladas y presentan cambios significativos a nivel fenotípico.

3. *Control del transporte de transcritos al citoplasma*

Regulación traduccional

Varios mecanismos están involucrados en la regulación de la expresión génica a nivel de la traducción y una cantidad en aumento de secuencias reguladoras han sido descritas en las regiones 5' y 3' que no son traducibles (UTRs). Además de los FT de unión al DNA descritos anteriormente, existen proteínas de unión al RNA, con motivos estructurales también característicos, que usualmente regulan la expresión génica. Los casos más estudiados de regulación mediada por este tipo de interacción RNA / proteínas ocurre al nivel de secuencias UTR.

Regulación de la actividad de la proteína

Algunas proteínas, luego de sintetizadas, permanecen en un estado inactivo. Existen diferentes vías que favorecen su activación: clivado por otras proteínas cuya expresión también se encuentra finamente regulada (Ej. efecto de la transglutaminasa tisular sobre la maduración de TGF-β), cambios en su estado de fosforilación que les confieran cambios conformacionales. Éstos podrían permitir o

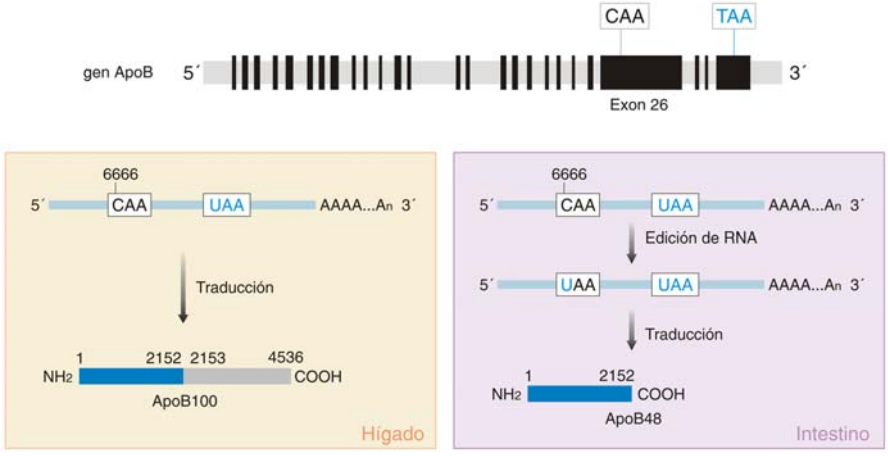


Figura 11.
La expresión del gen de la apoliproteína B en el intestino involucra edición del RNA.
En el codón 2153 (CAA) se especifica para el aminoácido glutamina; el producto ApoB100 es sintetizado en el hígado. En el intestino el mismo CAA es editado para codificar para un codón de parada (UAA), dando como resultado un producto más corto, ApoB48 (Adaptado de Strachan T y Read PA, 1999).

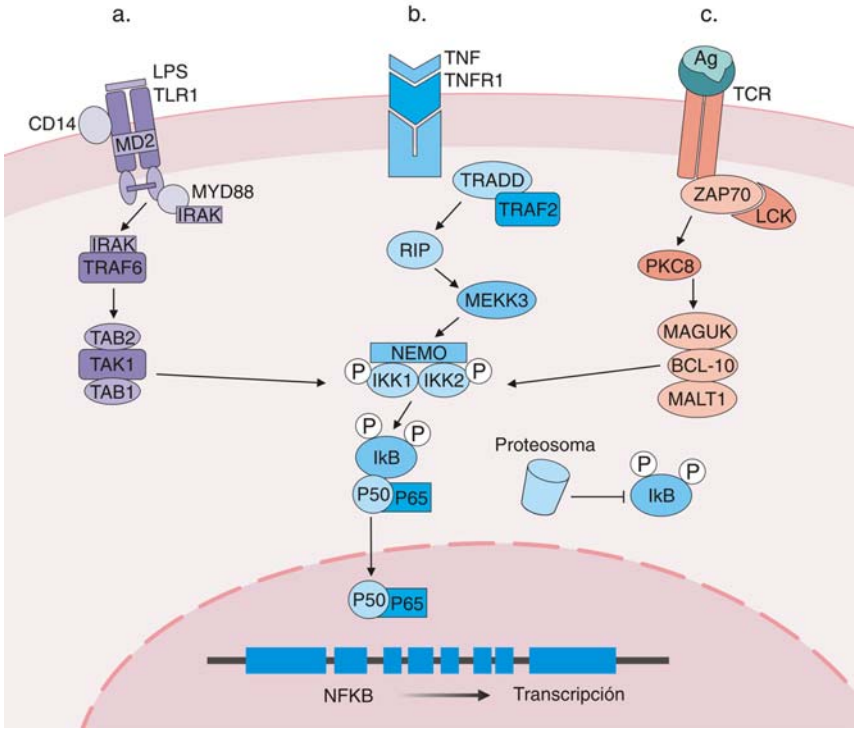


FIGURA 12.

Efectos de inhibidor IKβ sobre el factor transcripcional NFκB.

La actividad del factor nuclear-kB es estimulada por medio de diversas vías de señalización, lipopolisacaridos (LPS), el factor de necrosis tumoral (TNF) y receptor de la células T (TCR), entre otros. Las quinasas IKK1 e IKK2 y la subunidad reguladora moduladora esencial (NEMO) son el punto de convergencia de las tres vías de señalización. a. La unión de LPS al complejo receptor TLR4 – CD14 – MD2 activa la cascada intracitoplasmática que influye en el reclutamiento de MYD88 (gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide) e IRAK (Quinasa asociada al receptor de la IL1); la activación de IRAK resulta en la fosforilación de TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF) el cual puede dirigir la señal a través del complejo TAK1-TAB1-TAB2 hacia los complejos de IKK, para así activar la vía. b. La activación del receptor 1 de TNF, el cual promueve el reclutamiento de TRADD, que al mismo tiempo interactúa con el carboxi – terminal de TRAF2, el cual posee afinidad por MEKK3 y RIP, probablemente los que ligan al TNF con el complejo de IKK, lleva a la activación de la vía. c. La respuesta a estimulación de células T en el momento de presentación antigénica o anticuerpos anti - CD3 es la rápida translocación de PKC8 a la membrana plasmática, los componentes que conectan al complejo de IKK están poco definidos, pero complejos trimoleculares (MAGUK - BCL10 - MALT1) han sido implicados. En el momento en que la vía sea activada por cualquiera de las tres opciones, se inhibe la transcripción de NFkB y con ello la transcripción de genes blanco involucrados en fenómenos inflamatorios.

impedir su interacción con activadores o inhibidores (Ej. efectos de inhibidor IKβ sobre el factor transcripcional NFκB) (Figura 12).

III. Regulación epigenética

Además de los factores genéticos, ciertos factores adicionales pueden ser transmitidos a las células de la progenie luego de la división celular, que no son directamente atribuibles a la secuencia de DNA; estos han sido descritos como fenómenos epigenéticos. El término epigenética define todos los cambios heredables cuya transmisión no es genómica. El término epigenoma incluye a la estructura de la cromatina así como al nivel de metilación del DNA, factores que están involucrados en el control de la expresión génica.

La metilación del DNA es un fenómeno epigenético que es importante en el control de la expresión genética en los mamíferos, actuando como factor represor de la transcripción. El fenómeno de metilación activa es multifacético, ya que se desempeña en el silenciamiento de elementos transponibles, la defensa contra agentes virales y la represión transcripcional de ciertos genes.

Se han descrito gran variedad de mecanismos que afectan la estructura de la cromatina a nivel de un gen y por ende su capacidad para expresar los productos génicos. En algunos casos, estos mecanismos aseguran que dentro de una célula sólo uno de los dos alelos heredados parentalmente sea normalmente expresado, incluso, aunque la secuencia de nucleótidos del alelo que no es expresado sea idéntica al que está siendo expresado. La metilación en el carbono 5 de la citosina ha sido reconocida como elemento principal de los mecanismos de silenciamiento genético.

La metilación del DNA establece un patrón génico diferencial de expresión

Patrones de metilación en vertebrados

Una vez que han sido establecidos patrones de expresión diferencial, los diferentes mecanismos epigenéticos pueden asegurar que la herencia de estos patrones sea estable en el momento de la división celular.

La metilación del DNA, se cree, tiene un papel decisivo y principal al respecto, puesto que dichos patrones de metilación son transmitidos en forma estable de una célula diploide a sus progenitoras. En este proceso sin duda

interviene la conformación de la cromatina. El resultado final de la transmisión estable de un patrón de metilación consiste en la represión y/o silenciamiento de la expresión génica. No obstante, la función específica de la metilación en eucariotas es poco conocida y adicionalmente se han encontrado patrones de metilación diferentes entre especies. Por ejemplo, organismos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae* no presentan metilación detectable a nivel genómico. En aquellos organismos donde la metilación ocurre, los patrones y funciones pueden diferir.

Los patrones de metilación difieren entre células eucariotas y procariotas. En bacterias pueden metilarse la adenina y la citosina mientras que en los vertebrados la metilación se restringe a la citosina. Aproximadamente el 3% de las citosinas del DNA humano son metiladas, pero su mayoría se encuentran en los islotes CpG. Adicionalmente, el genoma contiene un porcentaje aún menor de citosinas metiladas en secuencias de tipo CpNpG, donde la posición N es ocupada por cualquiera de los nucleótidos.

Los residuos de citosina en vertebrados son blanco de metilación por una proteína específica denominada citosin metiltransferasa. La metilación ocurre en el carbono 5 de la citosina para generar una 5-metilcitosina, la cual es químicamente inestable y puede deaminarse espontáneamente para generar timina (T) (Figura 13).

Mantenimiento de la metilación

A diferencia de las metilasas bacterianas, las metiltransferasas en vertebrados presentan una fuerte preferencia para el reconocimiento de DNA hemimetilado (DNA metilado en una sola hebra). El patrón de metilación en una de las hebras funciona como molde para la metilación de la otra hebra. Luego de la replicación celular, las secuencias palindrómicas CpG, en cada hebra nueva de DNA adquieren el mismo patrón de metilación de las hebras parentales. Como resultado de lo anterior, los patrones de metilación son eficientemente transmitidos a las células hijas. A este fenómeno de perpetuación del patrón se le conoce como "mantenimiento de la metilación" y es llevado a cabo por el producto del gen Dnmt1 (Gen de la DNA metiltransferasa, ubicado en el locus 19p 13.2). Este gen es a su vez el principal mediador de metilación *de novo* junto con los genes Dnmt2 (Figura 13) y Dnmt3.

El patrón de distribución de 5-metilcitosinas en el genoma de las células somáticas diferenciadas varía de acuerdo al tipo celular, pero los mecanismos de mantenimiento de la metilación aseguran que los linajes celulares conserven casi estables sus patrones característicos.

Papel de la metilación en el genoma de plantas y animales

No todos los eucariotas están sujetos a la metilación del DNA. Aunque no ha sido completamente descifrada, su función en las células animales y vegetales parece ser primordial. La metilación del DNA está involucrada en la heredabilidad y en la flexibilidad de los estados epigenéticos. Modificaciones epigenéticas tales como la alteración en los niveles de metilación del DNA producen cambios en los patrones de transcripción tejido específica o permiten inactivar DNA foráneo. Se sugiere que cambios en la metilación serían un prerrequisito para producir cambios epigenéticos sobre la actividad transcripcional. Diferentes puntos de vista para aclarar su función se han concentrado en particular en aspectos de las células animales como son el tamaño del genoma (modelo de defensa del hospedero) y la forma de desarrollo (modelo de regulación génica).

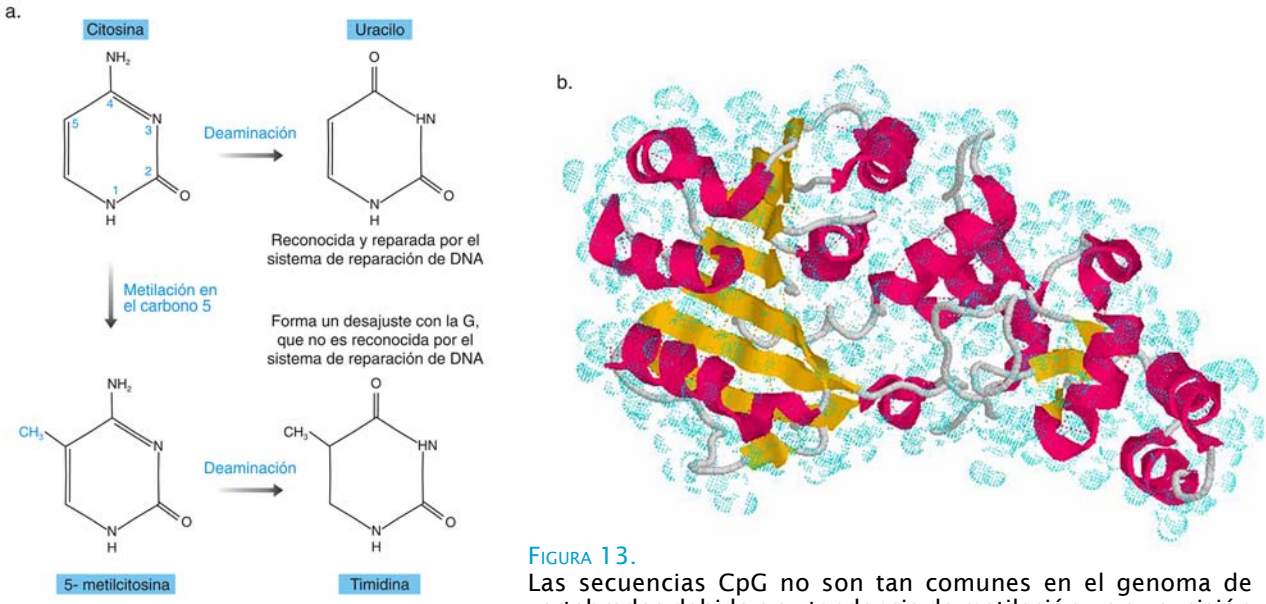


FIGURA 13.
Las secuencias CpG no son tan comunes en el genoma de vertebrados debido a su tendencia de metilación y a su excisión por enzimas de reparación del DNA.
a. Productos deaminados obtenidos a partir de la citosina y 5 – metil citosina.
b. Estructura de la DNA metil transferasa 2 (Dnmt2) humana.

El modelo de defensa del hospedero

Las células bacterianas poseen metilasas que presentan la misma especificidad de secuencia que poseen sus enzimas de restricción propias. Como resultado de lo anterior, las metilasas no reconocen las secuencias presentes en el genoma bacteriano precisamente por estar metiladas**.** Las metilasas actúan sobre DNA foráneo no metilado. Se deduce que**,** en procariotas, la función de la metilación sería de protección. Luego, en eucariotes se especula que su función sería la contención de la dispersión de transposones. Cerca de un tercio de las secuencias de DNA del genoma humano pertenece a familias de transposones, y se sabe que estas familias están altamente metiladas, ya que su contenido en 5-^{CH3}C representa cerca del 90% de las 5-^{CH3}C totales.

El modelo de regulación génica

Este modelo propone la metilación en vertebrados como un mecanismo de silenciamiento transcripcional. El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS "Post - Transcriptional Gene Silencing") está mediado por la hipermetilación de los promotores de genes transcripcionalmente silentes. Involucra a proteínas con dominios de unión a 5-^{CH3}C que se asocian a su vez con complejos desacetilantes de histonas (Figura 14). La acción de dichos complejos fortalece el PTGS mediante la producción de cromatina compacta (desacetilada) y transcripcionalmente reprimida. Mientras que la metilación en invertebrados puede servir para reprimir a los transposones y otros elementos foráneos presentes, en vertebrados puede desempeñar un papel principal como mecanismo de regulación en genes endógenos, reduciendo el ruido transcripcional innecesario. Mediante la reducción de expresión génica innecesaria, la metilación podría permitir el aumento del número de genes y adquisición de la complejidad característica del genoma de los vertebrados. Una refutación de esta propuesta es el estado de la metilación de las regiones 5' de genes en tejidos específicos, las cuales no pueden ser correlacionados con la expresión en diferentes tejidos. En los últimos años se han identificado genes involucrados en el silenciamiento a nivel transcripcional (Ej. gen MOM en *Arabidopsis thaliana*), cuya disrupción tejido - específica manifestaría esta aparente incongruencia.

Fenómenos epigenéticos

Exclusión alélica

Los genes autosómicos y los genes ligados al cromosoma X en hembras, son bialélicos debido a la contribución de un alelo por cada uno de los parentales. En los machos que poseen sólo un cromosoma X y un Y, la gran mayoría de los genes ligados al sexo son monoalélicos: la mayoría de los genes del X no poseen un gen homólogo funcional en el Y. Algunos genes en el Y poseen homólogos funcionales en el X, y de esta forma son bialélicos.

Se asume que todos los alelos parentales son bialélicos y que éstos son expresados, a no ser que alguno de los alelos de un gen específico hubiese presentado mutaciones que afectaran la expresión. Sin embargo, en humanos y otros mamíferos, se conoce una represión en la expresión, ya sea el proveniente de un alelo paterno o materno en genes bialélicos. Este fenómeno se denomina exclusión alélica. En estos casos, se dice que el gen exhibe o es funcionalmente hemizigótico.

La expresión monoalélica de genes bialélicos ha sido demostrada para un número creciente de genes humanos y se ha propuesto la participación de diferentes mecanismos para explicar el fenómeno de exclusión (Tabla 3). A continuación se describen dos mecanismos de exclusión alélica: en el primero se encuentra la exclusión alélica según el parental de origen, donde el alelo expresado no es escogido azarosamente entre ambos alelos parentales**.** Esto puede indicar que para ciertos genes el alelo reprimido es siempre el paterno o materno. Varias observaciones

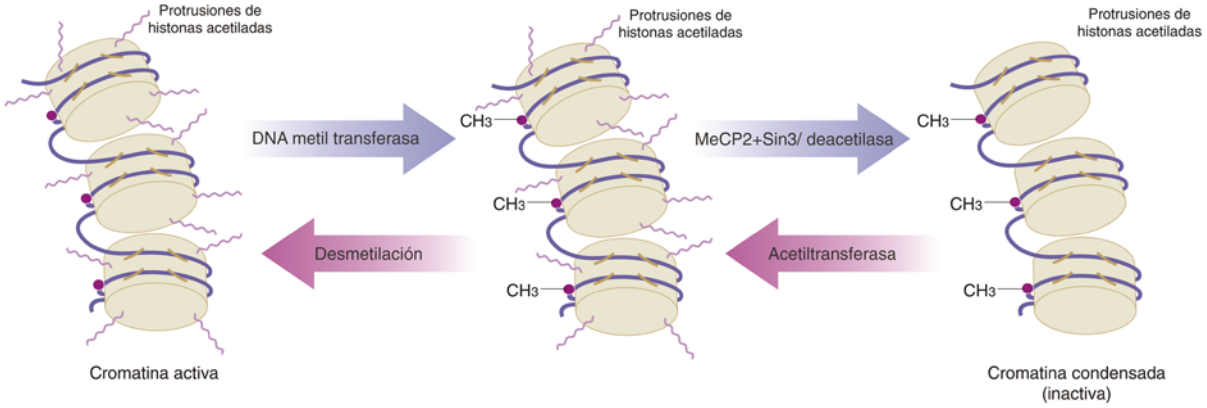


FIGURA 14.

Represión transcripcional por desacetilación de histonas mediada por metilación del DNA.

Los dinucleotidos CpG metilados son blanco de unión de proteínas especificas tales como MeCP2 (Proteína 2 de unión a CpG metilado), la cual actúa como represor de la transcripción, y adicionalmente forma un complejo corepresor formado por mSin3A y desacetilasas, removiendo los grupos acetilo de las histonas. El proceso contrario se observa cuando se produce la acetilación de las histonas, luego la dimetilación del DNA (ver Ng y Bird, 1999) (Adaptado de Strachan T y Read PA, 1999).

Tabla 3. Mecanismos de expresión monoalélica.

Mecanismo	Mecanismos específicos	Genes relevantes y localización celular
Exclusión alélica según el el parental de origen	Impronta	Muy pocos genes conocidos. Dependiendo del tejido y de la localización un gen especifico puede o no mostrar una expresión mono ó bialélica.
Exclusión alélica independiente del parental de origen	Exclusión alélica debido a Inactivación del cromosoma X	Confinado a algunos genes ligados al cromosoma X en hembras únicamente.
	Exclusión debido a rearreglos de DNA	Expresión génica de inmunoglobulinas en linfocitos B y expresión de genes para receptores de linfocitos T.
	Por un mecanismo desconocido	Genes de los receptores del olfato en neuronas. Genes de receptores de células NK. Algunos genes de interleuquinas (IL-2, IL-4).

han sugerido que los genomas paterno y materno en un individuo no son equivalentes, debido a que se han observado diferencias epigenéticas. Entre las secuencias de DNA presentes en los genomas del espermatocito y ovocito: una diferencia característica consiste en la cantidad total de metilación, la cual es mayor en el genoma del espermatozoide que en el óvulo, además de poseer diferentes patrones de metilación en cada genoma. Este mismo patrón de expresión puede ser transmitido fielmente a las células hijas en cada evento de división celular, siendo este un fenómeno meramente epigenético (Tabla 3).

El segundo mecanismo es la exclusión alélica independiente del parental de origen. Éste determina el alelo a ser reprimido de una forma aleatoria. Para que luego este patrón escogido al azar en las células iniciales sea transmitido a las células hijas durante cada evento de división celular. Por ejemplo, los genes de receptores olfatorios se encuentran organizados en grupos a nivel cromosómico en mamíferos. En una neurona individual del olfato, solamente un juego alélico de receptores está activo (Chess, 1998). La única forma de control son los rearreglos programados del DNA que son requeridos para la expresión celular individual en los genes de inmunoglobulinas en los linfocitos B y en el receptor de linfocitos T (TCR) (Tabla 3).

Influencia del genoma parental sobre su progenie (impronta genómica)

Un acercamiento para determinar la impronta de un gen es identificar un individuo que sea heterocigoto para una variante del mRNA. Este mRNA puede ser luego examinado a nivel de la expresión en el tejido específico según sea su expresión monoalélica o bialélica, para luego determinar la variante proveniente de cada parental. En algunos genes ha sido observado que la impronta es confinada sólo a cierto tipo de tejidos y fases del desarrollo. Así, la impronta permite obtener un nivel de control génico adicional aún más complejo. Lo anterior sugiere que algún mecanismo debe ser capaz de distinguir entre los alelos heredados paternos y maternos, y un mecanismo básico para mantener el estado de impronta es la metilación alelo específica.

Durante el desarrollo se espera que la impronta sea invariablemente heredada durante numerosos ciclos sucesivos de replicación. Adjuntamente, se espera que exista un mecanismo de eliminación de la impronta en el momento de la transmisión genética a través de la línea germinal, en el momento del paso del material genético de un parental a su progenie. De nuevo, se puede prever que la desmetilación ocurriría en el embrión durante las fases tempranas del desarrollo, proyectando como resultado un estado esencialmente desmetilado en las células germinales primordiales (Figura 15).

Inactivación del cromosoma X

La inactivación del cromosoma X es un proceso que ocurre en todos los mamíferos, resultando en la inactivación selectiva de alelos en alguno de los dos cromosomas en las hembras. Este proceso provee un mecanismo de compensación de dosis para genes que no poseen homólogos en el cromosoma Y.

En individuos que tienen un número anormal de cromosomas X, un único cromosoma permanece activo no importando cuántos estén presentes. Entonces, debe existir alguna clase de mecanismo de conteo que asegure la persistencia de un solo cromosoma X activo, por cada juego diploide de cromosomas autosómicos.

Estructura de la cromatina

La cromatina transcripcionalmente activa e inactiva del DNA difiere en un número de características que incluyen el grado de compactación y en gran medida la metilación. La metilación fuera de las secuencias de los promotores generalmente no bloquea la transcripción en estas regiones, no hay duda que la metilación en los promotores está correlacionada con un silenciamiento transcripcional. Adicionalmente, la cantidad de acetilación a nivel de las histonas es un factor importante. Las acetiltransferasas específicas para histonas adicionan grupos acetilo a resíduos de lisina cerca del dominio N-terminal de las mismas. El N-terminal acetilado, luego forma protusiones que se extienden fuera del nucleosoma (Figura 14). Las histonas acetiladas, se piensa, que poseen una afinidad reducida por el DNA y posiblemente entre ellas mismas; la cromatina debe ser capaz de adoptar una estructura más abierta y apropiada para la expresión génica. En el caso contrario, la deacetilación de la cromatina promueve condensación y represión transcripcional.

Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y epigenética

Los patrones de metilación no son fijos. Diferentes patrones de metilación cambian la expresión génica y pue-

den contribuir a desencadenar procesos autoinmunes. La primera evidencia de la contribución de la metilación a la autoinmunidad se observó primero en los linfocitos T. Estudios con linfocitos T CD4+ y el inhibidor de la metilación 5-azacitidina (5-azaC) han demostrado la inducción de auto-reactividad. Inicialmente, observando cómo un tratamiento químico relativamente sencillo pudiese ocasionar autorreactividad en linfocitos T normales se propuso que un mecanismo similar pudiese estar actuando *in vivo*. Lo anterior fue probado mediante ensayos con modelos murinos, a través del tratamiento de linfocitos T de ratones con 5-aza C *in vitro.* Luego, estas células fueron inyectadas en ratones singénicos. Los ratones que recibieron los linfocitos tratados desarrollaron anticuerpos anti-DNA y manifestaron evidencia histológica de autoinmunidad, muy similar al del LES en humanos. Estos estudios adicionales realizados, demostraron que el daño de la metilación del DNA en linfocitos T puede contribuir al desarrollo del lupus e impulsó su estudio en pacientes con LES.

En los estudios con pacientes se observó que los linfocitos T poseían un DNA globalmente hipometilado que se correlacionaba con una disminución en la actividad de la enzima DNA metiltransferasa (Dnmt1). Después, los mecanismos que pudiesen contribuir a la disminución en la actividad de la enzima se examinaron. Así, se encontró que los linfocitos T de pacientes con LES poseían la vía metabólica JNK (c-Jun NH_2 terminal Kinase) intacta, mientras que la vía de señalización ERK estaba disminuida y que la magnitud del defecto estaba directamente relacionado a la actividad de la enfermedad.

La sobreexpresión de otra molécula relacionada con autorreactividad e hipometilación en modelos murinos, LFA-1, hizo que se examinara el posible efecto de ésta en pacientes con LES y se encontró que los linfocitos T de pacientes con LES activo presentaban una sobreexpresión selectiva de LFA-1 en grupos específicos de linfocitos T autorreactivos.

Por lo anterior, la aberración epigenética de secuencias de DNA puede ser responsable por la incidencia de cambio en el sistema inmunológico de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Agentes como la 5-azacitidina (azacitidina) y 5-aza-2'deoxicitidina (decitabina) pertenecientes a los inhibidores de la metiltransferasas afectan el nivel de metilación de las secuencias de los promotores causando cambios fenotípicos en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), los cuales son similares a los cambios observados en PBMC de pacientes con LES. Nuevos avances en la investigación de estos mecanismos epigenéticos podrían proporcionar un mayor entendimiento de la etiopatogénesis del LES lo cual podría facilitar el mejoramiento de sus principios terapéuticos.

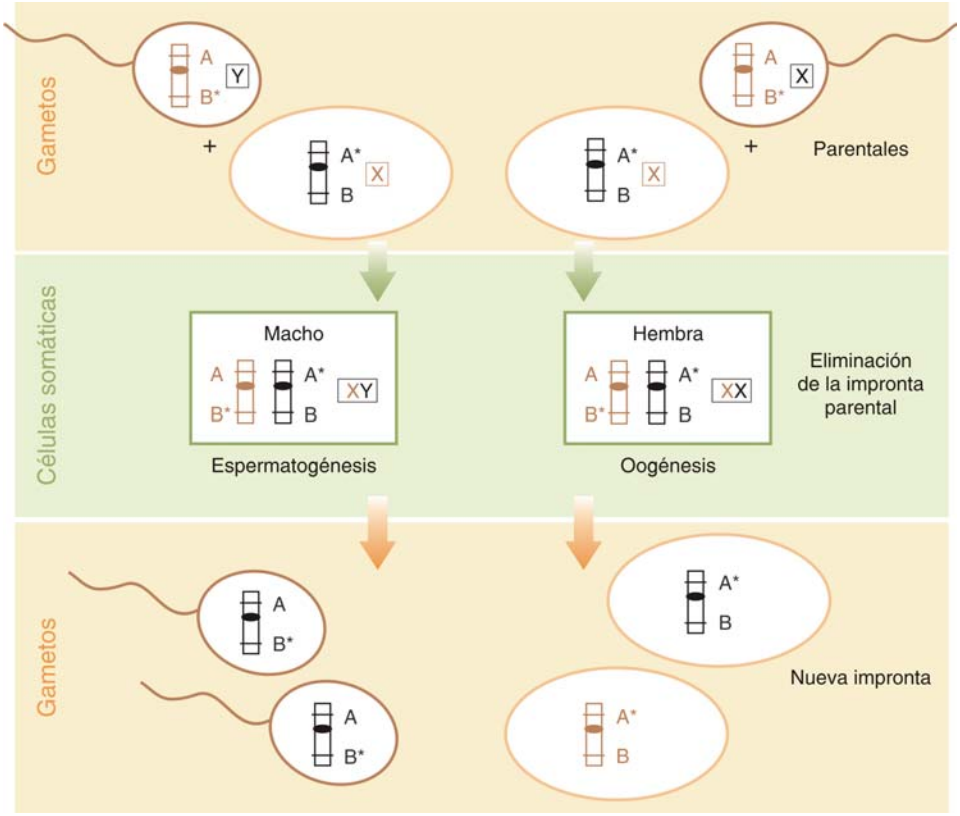


Figura 15.
La impronta gamética requiere eliminación de la impronta en la línea germinal.
El diagrama demuestra la dinámica de un cromosoma con dos genes, A y B, los cuales están sujetos a impronta. Los asteriscos indican cuál es el estado de impronta del gen. Como resultado, en células diploides somáticas el gen A es expresado cuando es heredado por línea materna y B es expresado cuando es heredado por línea paterna. Un cromosoma individual puede pasar a través de las líneas germinales de machos o hembras durante sucesivas generaciones: un hombre puede transmitir un cromosoma X heredado de su madre y una mujer puede transmitir un cromosoma heredado de su padre, como se indica en los gametos de la izquierda. Como resultado de lo anterior, debe existir un mecanismo en donde la impronta antigua sea borrada de la línea germinal antes de ser establecida una nueva impronta sexo específica.
Tomado de Strachan et al., 1999.

Lecturas recomendadas

Textos generales

- Read AP and Strachan T. Human Molecular Genetics. Second Edition. John Wiley and Sons, INC. New York.
- Griffiths AJF, Moiller JH, Suzuki DT, Lewontin RC and Gelbart. An introduction to Genetic Analysis. WM. W.H. Freeman and Company / New York.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London

Regulación transcripcional

- Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 15-22
- Ayoubi TA, Van De Ven WJ. Regulation of gene expression by alternative promoters FASEB J. 1996; 10: 453-460
- Smale ST. Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes Biochim. Biophys. Acta 1997; 1351: 73-88
- Geyer PK. The role of insulator elements in defining domains of gene expression Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 242
- Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes Biochem J. 1998; 331: 1-14
- Grosveld F. Activation by locus control regions? Curr Opin Genet Dev 1999; 9: 152-157
- Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action Science 1998, 281: 60-63
- Edwards-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C. Alternative poly (A) site selection in complex transcription units: means to an end? Nucleic Acids Res 1997; 13: 2547-2561
- Siomi H, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as regulators of gene expression Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 345-353
- Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, et al. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. Nat Genet 2003; 35: 349-356
- Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, et al. A n intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 2003 ;35: 341-348
- Prokunina L, Castillejo – Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet 2002; 32:666-669

Regulación postranscripcional

- Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes J Endocrinol 1998; 157: 361-371
- Hazelrigg T. The destinies and destinations of RNAs Cell 1998; 95: 451-460
- Lopez AJ. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation Annu Rev Genet 1998; 32: 279-305
- Ashkenas J. Gene regulation by mRNA editing Am J Hum Genet 1997; 60: 2378-2383
- Wahle E, Kuhn. The mechanism of 3 cleavage and polyadenylation of 3 eukaryotic pre-mRNA. Prog Nucl Acid Res Mol Biol 1997; 57: 41-71
- Stebbins-Boaz B, Richter JD. Translational control during early development Crit Rev Eukaryotic Gene Expression 1997;7: 73-94
- Wickens M, Anderson P, Jackson RJ. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3 end Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 220-232

Regulación epigenética

- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 2004; 27: 429457-63
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, y Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome Genomics 1992; 13: 1095-1107
- Jones PA.The DNA methylation paradox Trends Genet 1999; 15: 34-37
- Razin A, Kafri T. DNA methylation from embryo to adult Prog. Nucl. Acid Res 1994; 48: 53-81
- Simmen MW, Leitgeb S, Charlton J, Jones SJM, Harris B, Clark VH, Bird AP. Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. Science 1999; 283: 1164-1167
- Bestor TH. Cytosine methylation and the unequal developmental potentials of the oocyte and sperm genomes Am. J. Hum. Genet 1998; 62: 1269-1273
- Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and mammalian development Genes Dev 1999; 13: 26-34
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites Trends Genet 1997; 13: 335-340
- A. Chess. Expansion of the allelic exclusion principle Science 1998; 279: 2067-2068
- Ohlsson R, Tycko B, Sapienza C. Monoallelic expression: 'there can only be one' Trends Genet 1998; 14: 435-438
- Lyon MF. X-chromosome inactivation Curr. Biol 1999; 9: R235-R237
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasier JM, Bestor TH. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells Development 1998; 125: 889-897
- Reik W, Walter J. Imprinting mechanisms in mammals Curr Opin Genet Dev 1998; 8: 154-164
- Tilghman SM. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development Cell 1999; 96: 185-193
- Brannan CI, Bartolomei MS. Mechanisms of genomic imprinting Curr Opin Genet Dev 1999; 9: 164-170
- Ng H-H, Bird A. DNA methylation and chromatin modification Curr Opin Genet Dev 1999, 9: 158-163 (PubMed)
- Kleinjan D-J, Van Heyningen V. Position effect in human genetic disease Hum Mol Genet 1998; 7: 1611-1618
- Richardson B. DNA methylation and autoimmune disease. Clin Immunol. 2003; 109:72-9
- Januchowski R, Prokop J, Jagodzinski PP. Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Appl Genet 2004; 45:237-48

2

RESPUESTA INMUNE INNATA

Beatriz Aristizábal
Ángel González
Bernardo Pérez-Cuevas
Valentin Florez
Catalina Martínez I.

Contenido

Introducción
Características y mecanismos de reconocimiento de patógenos
Componentes
- Barreras anatómicas y físicas
- Moléculas circulantes
- Componentes celulares

Fagocitosis
Inflamación
Citoquinas

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del sistema inmune de un individuo para evitar el paso de agentes nocivos tales como microorganismos, toxinas o cualquier cuerpo extraño que desee ingresar al organismo. Para cumplir esta función el sistema inmune innato utiliza una serie de factores, entre los cuales se encuentran las barreras anatómicas como son la piel y las mucosas (que retienen el paso de microorganismos y partículas extrañas). Además, se cuenta con enzimas como la lisozima (en la saliva y las lágrimas) y los ácidos grasos de la piel, los cuales se caracterizan por tener un papel microbicida. Si un antígeno logra traspasar estas barreras, es atacado y destruido por otra serie de componentes como células, receptores celulares y factores solubles del torrente sanguíneo, que son los anticuerpos naturales, los factores del complemento, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión.

Durante la activación de la respuesta inmune tardía se generan procesos tales como la fagocitosis y la inflamación, como recurso para eliminar los antígenos y como puente para activar la respuesta inmune adquirida, desencadenando los mecanismos de la inmunidad específica.

Introducción

El medio ambiente que nos rodea resulta muy hostil, en él se encuentra una variedad importante de agentes infecciosos y contaminantes ambientales de forma, tamaño, composición y caracteres agresivos diferentes, ante los que el ser humano se ha visto obligado a desarrollar mecanismos de defensa para protegerse y evitar la instauración de las infecciones. La respuesta inmune innata es filogenéticamente más antigua que la respuesta inmune adquirida y ha evolucionado para brindar protección contra patógenos tales como bacterias, virus y parásitos aumentando cada vez más la efectividad y complejidad de su respuesta, haciéndose presente en todos los organismos multicelulares.

Los mecanismos de protección contra la infección y la enfermedad son varios, por lo regular se dividen en dos categorías:

1. *Innatos o inespecíficos.* Consisten en la activación de defensas preexistentes como son las barreras naturales (piel y mucosas) y las secreciones.
2. *Inmunidad adaptativa o específica.* Dirigida de manera particular contra un antígeno.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, cuyo objetivo principal es combatir la infección y atacar los microorganismos patógenos antes de que éstos alcancen a activar la inmunidad adquirida, ya que las señales producidas por la inmunidad innata, pueden controlar algunos aspectos de la inmunidad específica.

Esta respuesta está conformada por tres fases importantes: 1. prevención de la infección, 2. eliminación de microorganismos y 3. estimulación de la respuesta inmune adquirida. Para la correcta función de cada una de las fases, se hace necesaria la interacción de varios elementos, tales como: barreras físicas (barreras naturales), como el epitelio y las mucosas; componentes celulares, como las celulas dendríticas (DC), el sistema monocito/macrófago, las células asesinas naturales (NK), mastocitos, fagocitos y granulocitos; compuestos químicos y enzimáticos y un sistema de receptores celulares, entre los cuales se encuentran los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) y entre ellos, especialmente los receptores tipo Toll (TLR). De manera integra todos estos elementos generan los pasos necesarios para la eliminación no específica de microorganismos a través de procesos como la fagocitosis y la inflamación.

Características de la respuesta inmune innata y sus mecanismos de reconocimiento de patógenos

Una de las principales características de la respuesta inmune innata es su capacidad para reconocer componentes estructurales de microorganismos patógenos, que son exclusivos de ellos y que no están presentes en células de mamíferos normales, entre estos componentes estructurales se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs son polisacáridos y polinucleótidos que están presentes en la constitución de los procariotas, que difieren en muy pequeña escala entre un patógeno y otro. La respuesta contra estos PAMPs es inmediata luego de que se establece el contacto con el PRR. Entre los PAMPs más importantes están la flagelina, los peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos de las bacterias gram positivas, los lipopolisacáridos (LPS) en bacterias gram negativas, la manosa de las levaduras, los glucanos que forman parte de la membrana celular de los hongos y las islas CpG del DNA bacteriano, ausentes en el genoma de vertebrados en condiciones normales.

Otra característica destacada de la inmunidad innata es su capacidad de reconocer productos microbianos básicos para la sobrevida del microorganismo, lo cual pretende asegurar la eliminación rápida y eficaz del patógeno, antes de que se instaure la infección. No obstante, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de evasión para el reconocimiento de estas estructuras.

De otra parte, los receptores del sistema inmune innato son codificados por línea germinal, por tanto son menos variables comparados con los receptores de la respuesta inmune adquirida, que se generan por recombinación somática, dando origen a cerca de 10^7 receptores diferentes, comparados con los 10^3 receptores existentes para la inmunidad innata. Esta diferencia ha generado otra característica de la respuesta innata, ya que mientras la inmunidad adquirida puede distinguir entre diferentes antígenos de un microorganismo, la inmunidad innata sólo identifica clases de microorganismos, por ello el reconocimiento no se hace a nivel molecular. Lo que conlleva a que la respuesta inmune innata es inespecífica. Igualmente, la respuesta inmune innata cuenta con otra característica importante que es la falta de generación de memoria inmunológica luego del reconocimiento del patógeno.

Componentes de la inmunidad innata

La inmunidad innata está conformada por las barreras anatómicas y las proteínas circulantes, además del componente celular (Tabla 1).

Barreras anatómicas y físicas

Las barreras entre el ambiente y el hospedero son la piel, las mucosas del aparato digestivo, respiratorio y genitourinario, conformadas por un epitelio continuo que evita la entrada de microorganismos. Dichos epitelios producen péptidos con una función antibiótica natural, como las defensinas. La síntesis de defensinas aumenta en respuesta a citoquinas inflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), producidos por macrófagos y otras células, en respuesta a microorganismos que buscan ingresar a través del epitelio.

En la epidermis de la piel y en el epitelio de las mucosas además de las defensinas se hallan los linfocitos T intraepiteliales (LT), que son en su mayoría LT gamma/delta (γδ), los que intervienen en la defensa del hospedero secretando citoquinas, activando fagocitos y destruyendo células infectadas. Además, hay una subpoblación de linfocitos B (LB-1) que secreta IgM, conocidos como anticuerpos

Tabla 1. Componentes de la inmunidad innata.

Componente	Función principal
Barreras:	
Epitelio	Previene la entrada del microorganismo
Defensinas	Destrucción del patógeno
Linfocitos intraepiteliales	Destrucción del patógeno
Células efectoras circulantes:	
Neutrófilos	Fagocitosis temprana y destrucción del patógeno
Macrófagos	Secreción de citoquinas, fagocitosis temprana y destrucción del patógeno
Células NK	Lisis de células infectadas y activación de macrófagos
Proteínas efectoras circulantes:	
Complemento	Destrucción del patógeno, opsonización de microorganismos y activación de los linfocitos
Colectinas (Mannose-binding lectin)	Opsonización de microorganismos y activación del complemento (vía de las lectinas)
Proteína C reactiva	Opsonización de microorganismos y activación del complemento
Factores de la coagulación	Localización de tejido infectado
Citoquinas:	
TNF, IL-1, quimioquinas	Inflamación
IFN-α,β	Resistencia a infecciones virales
IFN-γ	Activación de macrófagos
IL-12	Estímulo de la producción IFN-γ por las células NK y los linfocitos T
IL-15	Proliferación de células NK
IL-10	Control de la inflamación
TGF-β	

naturales, que actúan como centinelas a través de las barreras anatómicas. A parte de estos componentes del epitelio y la mucosa, también son importantes los queratinocitos, las glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos, las cuales producen gran cantidad de ácidos grasos y las cilias de las células epiteliales mucosas del tracto respiratorio, que junto con el peristaltismo que se genera en el tracto gastrointestinal, conforman otra barrera física de barrido para algunos microorganismos patógenos.

Moléculas efectoras de inmunidad innata

Entre éstas están los compuestos químicos y enzimáticos, tales como, el ácido láctico, que inhiben el crecimiento de algunas bacterias y hongos; la lisozima presente en la saliva, lágrimas y secreciones nasales; el ácido clorhídrico de la mucosa intestinal, el cual genera un pH ácido, que junto con algunas proteínas digestivas como pancreatína y peptidasa, destruyen algunos patógenos del tracto gastrointestinal; además de los ácidos grasos de bajo peso molecular, los ácidos biliares, la transferrina, lactoferrina y fibronectinas que controlan la proliferación desordenada de la flora normal y el ingreso de patógenos a través de las mucosas.

De igual forma, muchas proteínas plasmáticas, tales como la lectina de unión a manosa (MBL del inglés mannose-binding lectin), que se comporta como opsonina, las colectinas y las lectinas, son factores circulantes encargados del control y localización de agentes patógenos que han logrado atravesar las barreras anatómicas hasta el torrente sanguíneo. Igualmente, en el sistema inmune innato se cuenta con la acción de factores de la coagulación, cuya función primordial es detener la hemorragia en caso de ruptura del epitelio y/o las mucosas y conformar trombos alrededor de los vasos sanguíneos, creando una pared al microorganismo, que evite el paso de éste hacia el torrente sanguíneo, para prevenir la infección y diseminación del microorganismo.

La proteína C reactiva, también hace parte de este conjunto de moléculas. Corresponde a una proteína plasmática, cuya función primordial es la de unirse a fosfolípidos de la membrana bacteriana, comportándose como una opsonina, capaz de unirse al factor C1q del complemento, para activar la vía clásica, al igual que tiene la capacidad de interactuar directamente con fagocitos y unirse a los receptores Fcγ.

Los componentes circulantes más importantes de la respuesta inmune innata corresponden a los factores del complemento, los cuales, a través de sus tres vías, pueden marcar, lisar y eliminar antígenos que entran al organismo, luego de atravesar las barreras anatómicas, generando un paso importante en este tipo de respuesta y creando un puente entre la inmunidad innata y adquirida (Capítulo 4).

Componentes celulares

Están formados por las células fagocíticas, que en conjunto participan en dos mecanismos importantes, la fagocitosis y la inflamación, modulados por el sistema inmune tanto innato como adquirido, y por una serie de citoquinas que hacen parte de la activación y función celular.

Las células implicadas en estos procesos son: los granulocitos polimorfonucleares, los monocitos/macrófagos, las DC y las NK, encargadas de llevar a cabo los mecanismos efectores de la inmunidad innata como son: la quimiotaxis, la diapédesis y la opsonización (Figura 1).

Granulocitos y polimorfonucleares

Los granulocitos son células efectoras que predominan en las fases avanzadas de la respuesta innata. Éstos tienen como función principal identificar, ingerir y destruir microorganismos a través de receptores y enzimas como la lisozima, colagenasa y elastasa. Dentro de este grupo de células están los neutrófilos (PMNN), los eosinófilos (PMNE) y los basófilos (PMNBs).

Neutrófilos

Corresponden a los leucocitos más abundantes y son muy efectivos en la fagocitosis y el patrullaje en circulación. Estas células se caracterizan por ser la primera línea celular que se hace presente durante la inflamación, luego de que se producen los estímulos quimiotácticos producidos por los factores del complemento como el C5a y las quimioquinas, que ejercen una función paracrina y autocrina sobre los demás PMNN. De igual manera, estas células se identifican por tener receptores para la fracción Fc de las Igs, lo que les permite aumentar la fagocitosis de microorganismos "marcados" por anticuerpos. Otra de sus tareas es la lisis celular de microorganismos patógenos, sobre todo bacterias, a través del contenido enzimático de sus gránulos.

Funciones efectoras de los neutrófilos en la inflamación aguda

Por medio de las enzimas contenidas en los gránulos intracitoplasmáticos pueden inducirse las vías oxígeno-dependientes y oxígeno-independientes durante la fagocitosis.

Mecanismo independiente del oxígeno

Éste incluye las proteasas lisosomales y glicolasas que pueden destruir la membrana de parásitos, bacterias, y la cápside de los virus. Además, se hallan las defensinas encargadas de destruir la membrana de los microorganismos patógenos por alteraciones osmóticas en el contenido celular.

Mecanismo dependiente del oxígeno

Los gránulos contienen enzimas tales como la superóxido dismutasa y la mieloperoxidasa que crean radicales libres de oxígeno (O_2-OH-H_2O_2). Además de lisozima, proteínas catiónicas, elastasas y catepepsina G, que utilizan el oxígeno para generar la lisis del microorganismo. Así mismo, tienen sintasa de óxido nítrico (NOS) que produce NO, NO_2, HNO_2, y peroxidasas de lípidos que inducen oxidación en la membrana lipídica.

Eosinófilos

Estos PMN son menos abundantes que los neutrófilos. La mayoría están contenidos en el aparato respiratorio, digestivo y urinario y muestran de igual manera función fagocítica. Su función efectora está dada más que todo por la degranulación y liberación de sustancias, tales como la histamina, proteína catiónica, proteína básica mayor,

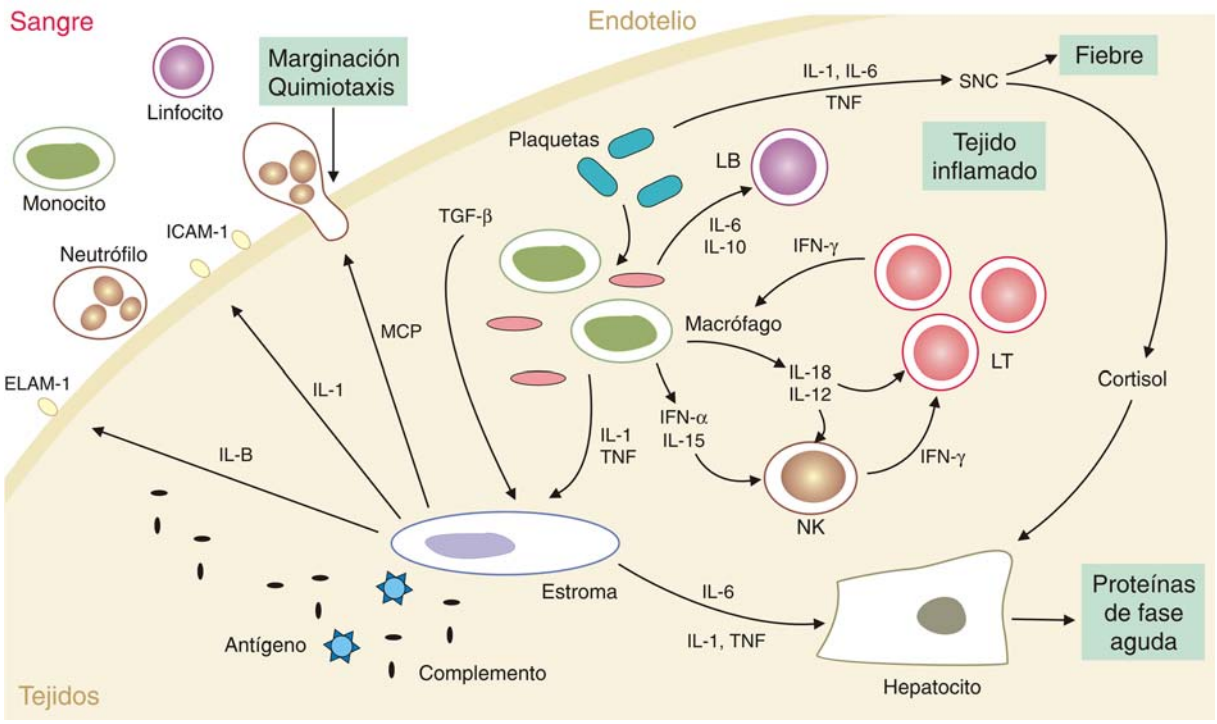


FIGURA 1.
Mecanismos efectores de la respuesta inmune innata.
La inmunidad innata involucra un conjunto de células, citoquinas y tejidos que generan procesos efectores tales como la fagocitosis, la inflamación y la síntesis de proteínas de fase aguda.

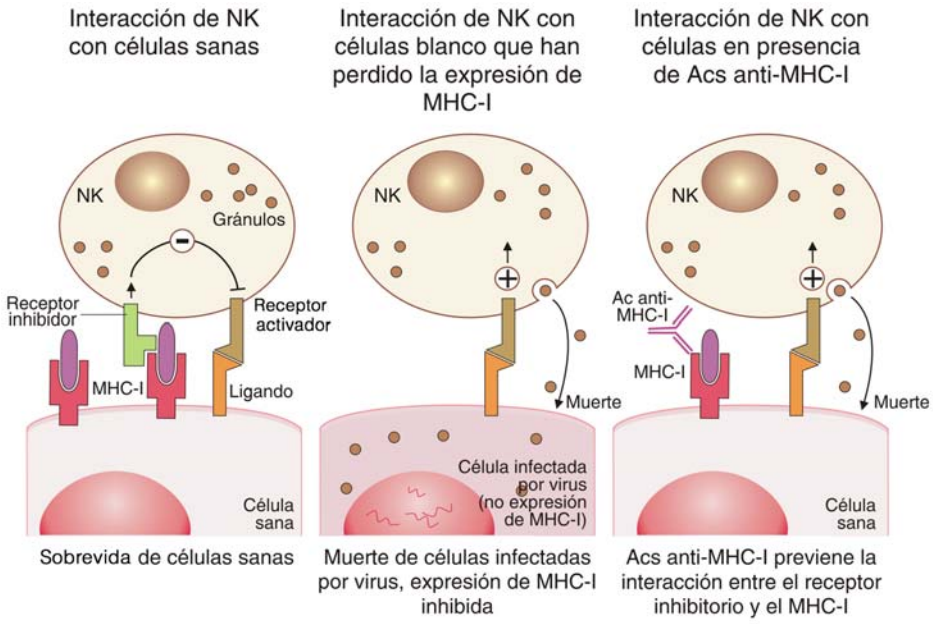


FIGURA 2.
Características funcionales de las células NK.
Mecanismos de reconocimiento y respuesta inmune innata celular. Las células NK pueden responder a células infectadas con virus o células tumorales en ausencia de moléculas MHC y presentación antigénica. La función de las células NK puede ser inducida una vez se inactiva la expresión de moléculas MHC.

sulfatasas y factores quimiotácticos como los leucotrienos y las prostaglandinas. Su degranulación es mediada por la IgE al igual que por factores quimiotácticos. La acción primordial de estas células corresponde a la destrucción de microorganismos patógenos, sobre todo parásitos, aunque también juegan un papel importante en procesos alérgicos, junto con los mastocitos.

Basófilos y mastocitos

Estas células no poseen gran actividad fagocítica, en cambio sí presentan receptores para la IgE. Los basofilos están en circulación, en menor proporción que el resto de PMN, mientras que los mastocitos se ubican a nivel de los tejidos, más en mucosas, donde siempre se produce la degranulación, sus gránulos contienen heparina, serotonina e histamina; igualmente, liberan una gran variedad de citoquinas que aumentan el proceso inflamatorio, en especial de tipo agudo. Estas células participan tanto en procesos infecciosos de tipo viral, como en fenómenos alérgicos.

Células dendríticas (DC)

Las DC son células fagocíticas y presentadoras de antígenos profesionales (CPA), estas células tienen importancia en la iniciación de la respuesta inmune primaria. Las DC están capacitadas para tomar el antígeno por diferentes mecanismos, tales como: endocitosis, fagocitosis pinocitosis y macropinocitosis. Los antígenos que ellas fagocitan son reconocidos a través de receptores de manosa presentes en su superficie celular. Ellas son importantes en la traslocación del antígeno desde la periferia a los nódulos linfáticos primarios en donde inician cambios estructurales y de presentación antigénica. Estas células son estimadas como unas de las más destacadas tanto en inmunidad innata como en inmunidad adquirida.

Células asesinas naturales (NK)

Las NK tienen un gran potencial inmunomodulador en la respuesta mediada por células, ellas poseen acción citotóxica, participan en la defensa antimicrobiana y en la «vigilancia inmunológica» contra el crecimiento tumoral, ayudando a mantener la homeostasis (Figura 2). Las NK emplean una estrategia que se llama «reconocimiento negativo», es decir, mientras que un linfocito T ó B se activa cuando reconoce la presencia del antígeno en las moléculas del MHC, las NK se activan cuando no pueden reconocer este antígeno presentado de la misma manera (vía MHC) sobre la superficie de la célula con la que entra en contacto. Los receptores de las células NK son «receptores inhibidores», puesto que mantienen suprimida la actividad lítica de la célula siempre y cuando estén detectando la presencia de antígenos del MHC. Las NK actúan sobre células infectadas, principalmente por virus, o células en transformación maligna, en las que está abolida, disminuida o alterada la expresión de moléculas MHC.

Monocitos /macrófagos

El sistema monocito macrófago, al igual que las DC, son uno de los componentes celulares más importantes, tanto en inmunidad innata como adquirida. El monocito es una célula de vigilancia, que circula por el torrente sanguíneo, la cual tiene la facultad de pasar a tejidos que han sido infectados por microorganismos o agentes extraños. Una vez activados en los tejidos, se conocen como macrófagos; estas células hacen varios oficios: 1. Activación linfocítica, ya que hacen parte de las CPA profesionales, que activan tanto linfocitos T como B. Además, favorecen la secreción de interleuquina 1 en linfocitos. 2. Modulan la respuesta inmune, 3. Estimulan la inflamación y liberación de citoquinas luego de la fagocitosis. 4.

Participan en la reorganización tisular, favoreciendo la acción de factores cicatrizantes como son las elastasas y colagenasas. 5. Presentan actividad antimicrobiana, a través de la presencia de radicales libres dependientes de oxígeno e hidrolasas independientes de oxígeno. Intervienen en la inmunidad contra tumores mediante la producción de factores citotóxicos.

Fagocitosis

Uno de los procesos más importantes de la inmunidad innata es la fagocitosis de microorganismos. En este proceso se ve primero una atracción de leucocitos hacia las zonas de infección, allí los macrófagos se encargan de ingerir los microorganismos a través de vesículas llamadas fagosomas, donde después se destruye el microorganismo (Figura 3). La fagocitosis es un proceso dependiente del citoesqueleto de la célula fagocítica y de los receptores de superficie que reconocen y unen el microorganismo. Entre estos receptores se encuentran:

Receptores endocíticos

Encargados de unir patógenos que contienen repeticiones de polimanosa en su membrana (un polisacárido que los vertebrados no poseen) para luego introducirlas al fagosoma, que a su vez, se une con un lisosoma. Dentro del lisosoma las proteínas de la membrana celular del invasor son procesadas y reducidas a pequeños péptidos, los que luego son expuestos de nuevo en la superficie del macrófago por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Otro receptor endocítico lo constituye el receptor de detritus celulares de los macrófagos, que promueve la fagocitosis y se destaca en la respuesta inmune innata.

Receptores de señalamiento

Estos receptores permiten identificar las macromoléculas de los patógenos, por ejemplo, los receptores de la manosa en los macrófagos, el CD14 que une ligandos lipídicos (lipopolisacáridos de los gram negativos, estreptococos y micobacterias tuberculosas).

Receptores tipo Toll (TLR)

Estos receptores pertenecen a los PRR y están ubicados en la superficie celular; estos receptores se unen a los PAMPs generando una señal que permite la liberación de moléculas efectoras como las citoquinas (Capítulo 3).

Una vez el patógeno ha sido reconocido a través de estos receptores, los macrófagos y PMN son activados para que se produzca la destrucción del microorganismo. Este proceso se lleva a cabo igualmente, con la ayuda de receptores celulares tales como: los receptores acoplados a proteína G, receptores Fc de las Igs, receptor C3 del complemento y receptores para citoquinas, en especial para el IFN-γ. Las señales enviadas por estos receptores conducen a la formación del fagolisosoma en los fagocitos, donde se activan los mecanismos microbicidas tanto oxígeno dependientes como independientes, discutidos previamente, al igual que se da la activación de enzimas proteolíticas.

Otra función importante generada por la activación de los fagocitos es la síntesis de citoquinas proinflamatorias, tales como la IL-1 y el TNF-α, al igual que la IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T, para que una vez instaurada la inflamación, éstos lleguen rápido al sitio de infección.

Inflamación

Este es un mecanismo de defensa inespecífico, generado como respuesta del organismo frente a la agresión (física, química o infecciosa), en donde se da un desplazamiento de leucocitos y moléculas plasmáticas hacia regiones de infección o daño tisular. Sus principales efectos son el aumento del flujo sanguíneo hacia la región afectada, el incremento de la permeabilidad vascular frente a las moléculas séricas de gran tamaño y la migración de leucocitos

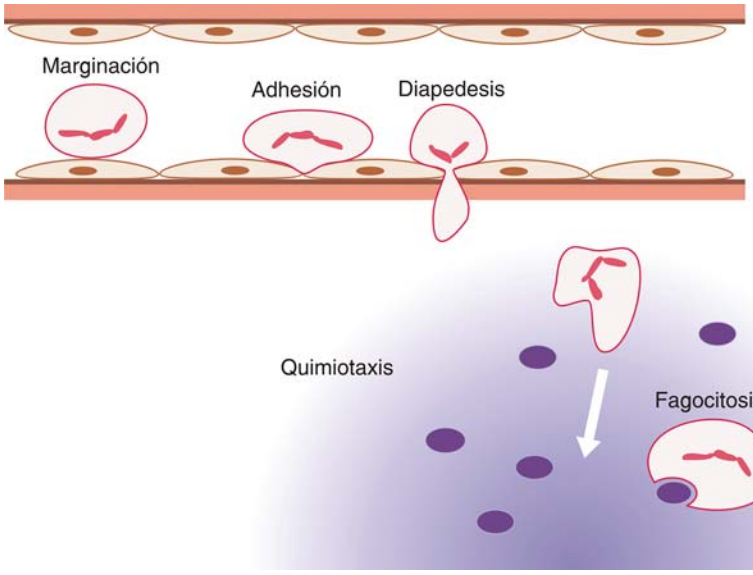


FIGURA 3.
Pasos para la fagocitosis.
La fagocitosis involucra varias fases como es la marginación: disminución del tráfico leucocitario y acercamiento al endotelio; la adhesión, dependiente de adhesinas que facilitan la adherencia de los leucocitos al endotelio, seguida de la diapédesis o extravasación, que involucra el paso de los leucocitos a través del endotelio, hasta el tejido infectado, para que por estímulos quimiotácticos llegue hasta el sitio de infección y se inicie el proceso de fagocitosis.

a través del endotelio vascular local en dirección a la zona inflamada. Estos mecanismos están sujetos a dos mecanismos reguladores: aumento del aporte sanguíneo local y de la permeabilidad capilar. El aumento de permeabilidad capilar se debe a la retracción de las células endoteliales, de tal forma que células y moléculas proinflamatorias puedan atravesar el endotelio y alcanzar el foco inflamatorio, lo cual en condiciones normales no sería posible. Las moléculas más destacadas, capaces de atravesar el endotelio son los anticuerpos, las proteínas plasmáticas y factores del complemento.

Los fagocitos, considerando a los PMNN y los monocitos, abandonan la médula ósea y migran hacia los tejidos periféricos, hacia zonas infectadas o inflamadas. Durante su ciclo vital, los neutrófilos llevan a cabo un único desplazamiento, mientras que los monocitos se transforman en macrófagos y pueden volver a la circulación y dirigirse a los tejidos linfoides secundarios, en donde actúan como CPA.

Los linfocitos vírgenes migran desde el timo y la médula ósea hacia los tejidos linfoides secundarios. Una vez activados por su antígeno correspondiente, los linfocitos T (LT) se tienden a desplazar hacia zonas de inflamación, mientras que los linfocitos B (LB) y LT de memoria se acumulan en tejidos linfoides.

El drenaje linfático y la migración leucocitaria garantizan el transporte hasta los ganglios linfáticos de los linfocitos, las CPA y los antígenos procedentes de tejidos infectados o inflamados, mientras que los antígenos que circulan en la sangre son capturados por el bazo.

A partir del momento en que están en el torrente circulatorio, la migración de células depende de la expresión de moléculas de adherencia en el endotelio: en regiones inflamadas el endotelio expresa moléculas de adherencia capaces de ser reconocidas por los receptores de los linfocitos activados o por los fagocitos, que son capaces de atraer otras células hacia esas zonas. Las reacciones tisulares que se producen como respuesta a las lesiones tisulares o a las infecciones se llaman reacciones inflamatorias.

Cuando se dan respuestas inmunitarias en los tejidos como respuesta a un estímulo antigénico, las diferentes poblaciones celulares suelen ir apareciendo en fases sucesivas. El tipo de célula presente, su abundancia relativa y el momento en que acuden a la zona depende más que todo de la naturaleza del estímulo antigénico y de la región afectada. En general, los neutrófilos son las primeras células que llegan a los focos de inflamación aguda por procesos infecciosos. Durante varios días son el tipo celular más abundante. A partir del primer día comienzan a acudir a la zona inflamada fagocitos mononucleares y algunos linfocitos. Por último, llegan las células T CD8+ y algunas células B. La evolución de una reacción inflamatoria aguda depende de la posibilidad de eliminar al antígeno y/o al agente infeccioso. Cuando esta eliminación no es posible, la reacción inflamatoria evoluciona hacia la cronicidad. En estos casos escasean los PMNN, pero se acumulan grandes cantidades de linfocitos T CD4+ y macrófagos.

Migración celular

El proceso de migración leucocitaria consta de dos fases principales: la unión entre la células circulantes y el endotelio vascular, que va seguida del deslizamiento de dichas células entre las células endoteliales (diapédesis) o a través de las mismas (emperipolesis). En la segunda fase, una vez atravesado el endotelio, las células migran hacia la región infectada o inflamada, guiadas por estímulos quimiotácticos como se verá más adelante en el Capítulo 11. Los patrones de migración celular son complejos, y no sólo dependen del tipo de célula sino también de su grado de diferenciación y activación. Además, el endotelio vascular es diferente en las distintas regiones del organismo, un hecho que también afecta a los fenómenos de migración (Figura 3).

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas conocidas como las hormonas del sistema inmune, éstas se encargan de mediar las interacciones entre las células involucradas tanto en respuesta inmune innata como adquirida. Las citoquinas participan en la fase de activación y la fase efectora de las células involucradas en la respuesta inmune innata, entre las más importantes se encuentran el TNF-α, la IL-1 y los IFNs tipo I. No obstante, algunas otras citoquinas son también importantes en este tipo de inmunidad (Tabla 2). La función y características de estas citoquinas se discute ampliamente en el Capítulo 11.

TABLA 2. Citoquinas de la inmunidad innata.

Citoquina	Fuente celular	Células blanco y efectos biológicos.
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Macrófago y célula T	Células endoteliales: activación. Neutrófilos: activación. Hipotálamo: fiebre. Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda.
Interleuquina 1 (IL-1)	Macrófagos, células endoteliales	Células endoteliales: activación. Hipotálamo: fiebre. Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda.
Quimioquinas	Macrófagos, células endoteliales, células T	Leucocitos: quimiotaxis, activación.
Interleuquina 12 (IL-12)	Macrófagos, células dendríticas	Células NK y células T: síntesis de IFNγ, aumento de actividad citolítica. Células T: diferenciación hacia Th1.
IFN tipo I (IFN-α, IFN-β)	IFN-α: macrófagos IFN-β: fibroblastos	Todas las células: estado antiviral, aumento de la expresión del MHC de clase I. Células NK: activación.
Interleuquina 10 (IL-10)	Macrófagos, células T (Th2)	Macrófagos: producción de IL-12, expresión de moléculas coestimuladoras y del MHC de clase II. Células B: proliferación.
Interleuquina 6 (IL-6)	Macrófagos, células endoteliales, células T	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda. Células B: proliferación de células productoras de anticuerpo.
Interleuquina 15 (IL-15)	Macrófagos	Células NK: proliferación. células T: proliferación.
Interleuquina 18 (IL-18)	Macrófagos	Células NK y Células T: síntesis de IFNγ.

Lecturas recomendadas

1. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1989; 54: 1-13
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20: 197-216
3. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. On the semantics of immune recognition. Res Immunol. 1996; 147: 208-14
4. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. N Engl J Med 2000; 343: 338-44
5. Lanier LL. On guard-activating NK cell receptors. Nat Immunol 2001; 2: 23-7
6. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol 1995; 57: 827-72
7. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO et al. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. Annu Rev Immunol 1996; 14:155-77
8. Tomlinson S. Complement defense mechanisms. Curr Opin Immunol 1993; 5: 83-9
9. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. Immunol Today 1991; 12: 322-6
10. Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. Microbes Infect 2000; 2: 289-94
11. Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ et al. The role of Fcgamma receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against Neisseria meningitidis in complement-deficient individuals. Clin Exp Immunol 2000; 120: 338-45
12. Kaisho T, Akira S. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. Crit Rev Immunol 2000; 20: 393-405
13. Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. Int.Arch.Allergy Immunol. 2003; 130: 180-92
14. Banyer JL, Hamilton NH, Ramshaw IA et al. Cytokines in innate and adaptive immunity. Rev Immunogenet 2000; 2: 359-73
15. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System, first of two parts. N Engl J Med 2000; 343:37-49
16. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System, Second of two parts. N Engl J Med 2000; 343:108-117
17. Chaplin DD. The immune system.Overview of the immune response. J allergy Clin Immunol 2003;111: S442-59
18. Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA: Saunders Co, 2003

3

RECEPTORES TIPO TOLL

Soraya Zorro
Gloria Vásquez

Contenido

Mecanismos de reconocimiento mediados por TLRs
Señalización por TLRs
Ligandos de TLR9
TLR9
Interacción TLR9-CpG
Secuencias CpG y autoinmunidad
TLR9 y LES
TLR2 y AR

La respuesta inmune innata tanto en Drosophila *como en mamíferos, es activada por microorganismos y otros estímulos a través de receptores como los Toll. Los receptores Toll fueron identificados inicialmente en moscas asociados a una función embrionaria, y ahora se sabe que son mediadores claves de la respuesta inmune innata tanto en infección como en autoinmunidad. Diferentes estímulos pueden activar a dichos receptores entre los que se pueden enunciar componentes de membrana de bacterias, RNA de doble cadena, DNAs tipo CpG, entre otras. Este capítulo discute las funciones generales de los Toll, mecanismos de transmisión de señales, y la implicación de TLR 9 con su respectivo ligando (DNAs tipo CpG), en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.*

Introducción

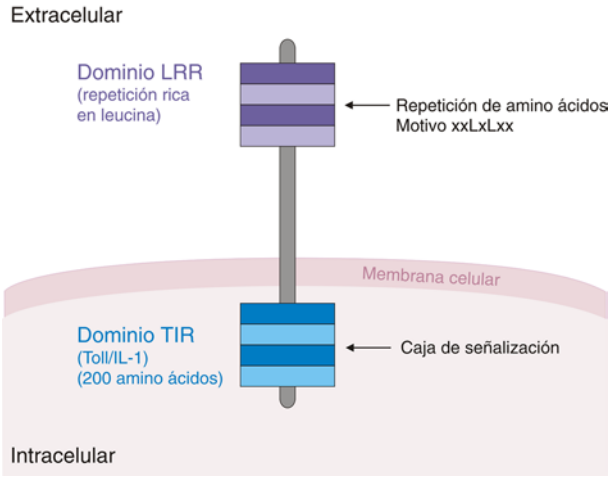
La respuesta inmune en los vertebrados se puede dividir en respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune adaptativa está mediada por los clones de linfocitos B y T, que se caracterizan por su especificidad y su capacidad de memoria (1) (ver Capítulo 7).

Por su parte, la respuesta inmune innata está mediada por macrófagos, células dendríticas y, en general, por todas las células con capacidad de ser presentadoras de antígenos (CPA), caracterizándose por una respuesta rápida que la hace muy importante en las fases tempranas a infecciones.

Por varias décadas se consideró que el reconocimiento de los patógenos por los macrófagos no era específico, ya que éstos no poseían receptores que sufrieran rearreglos. Sin embargo, actualmente hay evidencia que indica que la inmunidad innata puede discriminar los patógenos como no propios y reconocer, además, alteraciones estructurales y/o ausencia de moléculas propias. Para este reconocimiento las células de la inmunidad innata poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores reconocen en los microorganismos componentes estructurales denominados patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) (1).

Existen varios grupos de PRRs, expresados en la superficie celular o residentes en los compartimientos celulares (1,2). Una de las familias más importantes de los PRRs son los receptores tipo Toll (TLR) identificados inicialmente como una molécula esencial para el patrón de desarrollo embrionario de *Drosophila*, y luego como una molécula clave en la respuesta inmune antifúngica (3) (Figura 1). Las moléculas de la familia de los TLR presentan estructuras moleculares comunes, caracterizadas por regiones ricas en leucina en su porción extracelular y regiones intracitoplasmáticas homólogas al receptor de la IL-1 denominados dominios homólogos a los receptores Toll e Interleuquina 1 (TIR) (Figura 2). Debido a estas semejanzas se pensó que la contraparte de los TLR en los mamíferos era la familia de los receptores de la IL-1; sin embargo, esta hipótesis no se confirmó una vez se identificó el primer miembro de la familia de los TLR en mamíferos con homología estructural en las porciones intra y extracitoplasmática con la molécula antes descrita en *Drosophila*. Más de 10 miembros de la familia TLR pueden encontrarse en una búsqueda de las bases de datos públicas murinas o humanas (4) y once miembros y sus ligandos han sido ya reportados en los humanos (5-10) (Tabla 1).

Figura 1.
Estructura molecular de TLR.



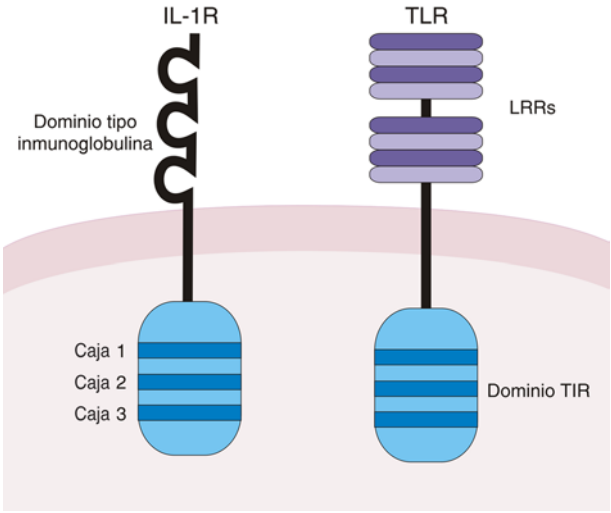


Figura 2.
Homología estructural entre TLR y el receptor de la IL-1 (IL-1R).
LRR: regiones ricas en leucina.

Los diferentes TLRs se comportan como PRRs y tienen la capacidad de unirse a diversos PAMPs. El TLR4 reconoce el lipopolisacarido (LPS) (11), TLR2 a lipoproteínas y glicolípidos (12), TLR3 el RNA de cadena doble, TLR7 a compuestos químicos como las imidazoquinoleínas, TLR5 a la flagelina (13), TLR9 a las secuencias CpG (9,14) y el TLR11 a uropatógenos (Figura 3) (10).

Existen también otros ligandos potenciales de los TLR. Las células sometidas a estrés o daño y que sufren apoptosis no pueden generar inflamación pero sí pueden inducir señales generadas por los cambios en los lípidos o carbohidratos hallados en las superficies celulares o, por expresión de proteínas que normalmente no se encontraban en la superficie externa de la célula. Un grupo de estas moléculas son las proteínas de choque térmico (HSP), que se incrementan en forma importante en situaciones de estrés (4). La cepa de ratones C3H/HeJ, que posee una mutante de TLR4, es resistente a la inducción de la activación del macrófago por las HSP-60, sugiriendo que la HSP-60 humana transmite señales a través de TLR4 (15). Se ha descrito también que la fibronectina puede activar TLR4 (16) y el peróxido de hidrógeno dispara la activación de NF-kB y AP1 a través de TLR2, debido a eventos celulares que conducen a la liberación, durante la muerte celular, de otros posibles ligandos endógenos de TLR2 (17).

Tabla 1. Receptores TLR con sus respectivos ligandos.

Receptor	Ligando exógeno	Ligando endógeno
TLR1	Lipopéptidos triacyl	NI
TLR2	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicanos Ácido lipoteicoico Lipoarabinomanan Modulina soluble en fenol Fosfolípidos tipo glicosilfosfoinosítidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacáridos atípicos Zimosán	HSP70
TLR3	RNA de doble cadena	NI
TLR4	Lipopolisacáridos Taxol Proteínas de fusión Proteínas de envoltura	HSP 60 HSP 70 Algunas porciones de la fibronectina Oligosacáridos del ácido hialurónico Fragmentos del sulfato de heparán Fibrinógeno
TLR5	Flagelina	NI
TLR6	Lipopéptidos de diacyl Ácido lipoteicoico Zimosán	NI
TLR7	Imidazoquinolona Loxoribine Bropirimina RNA de doble cadena	NI
TLR8	Imidazoquinolona RNA de doble cadena	NI
TLR9	DNA tipo CpG	DNA contenido en cuerpos apoptóticos
TLR10	NI	NI
TLR11	Bacterias uropatogénicas	NI

HSP: Proteína de choque térmico; NI: no identificado hasta el momento; TLR: receptor tipo Toll.

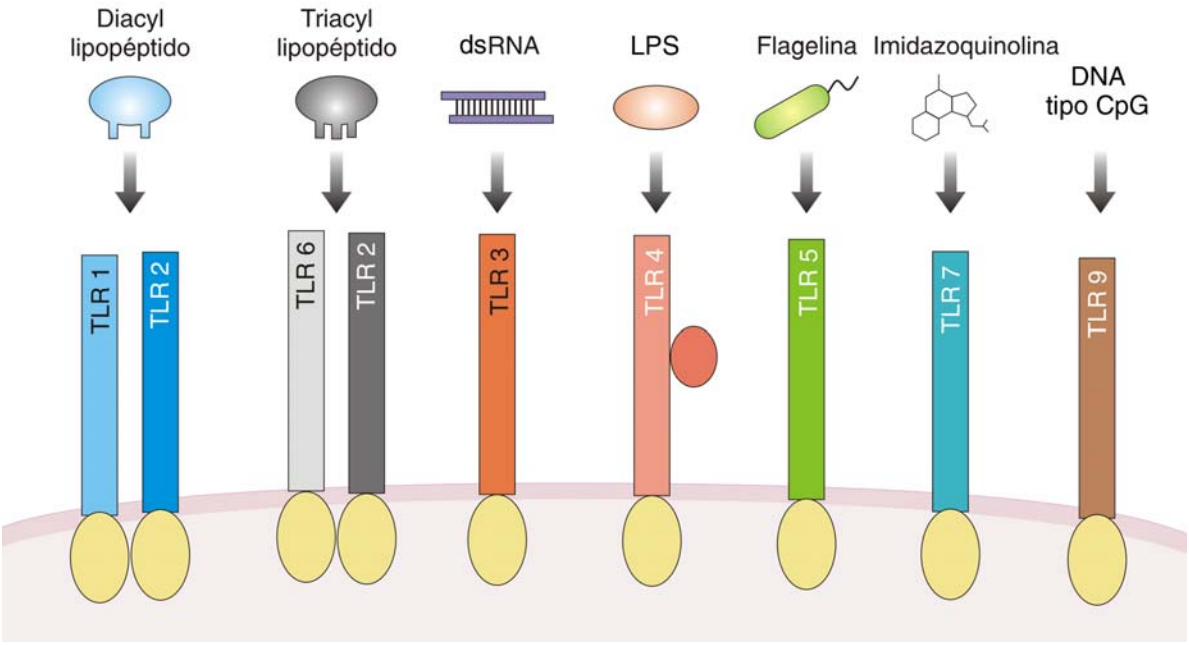


Figura 3.
Clases de TLR y sus respectivos ligandos.
LPS: lipopolisacárido; dsRNA: RNA de doble cadena.

Mecanismos de reconocimiento mediados por TLRs

La interacción entre los TLRs y sus ligandos es de baja afinidad; sin embargo, algunas moléculas asisten esta interacción o reconocimiento. Por ejemplo, el CD14 se sitúa cerca al TLR4 en la superficie celular y retiene el LPS para ser reconocido por el TLR4, facilitando su interacción. Otra proteína asociada que también ayuda en la interacción de TLR4 es MD-2. La heterodimerización entre receptores TLR es otra herramienta más que facilita el reconocimiento de los TLRs por sus ligandos (18).

La necesidad de proteínas adaptadoras y la formación de heterodímeros que permiten a los TLR establecer una interacción adecuada con sus ligandos ha sugerido que más que receptores, los TLR deberían considerarse como integradores de señales. La interacción de los agonistas y los TLR se lleva a cabo en un área focal de señalización activa, en la cual quizás interactúen complejos multiméricos de proteínas encontradas en las balsas lipídicas. En estos complejos pueden incluirse varios PRRs. Ante esta situación se ha sugerido que un contacto directo entre TLR y sus ligandos no es necesario y más bien los TLRs son fundamentales en la estabilización de la interacción con estos complejos de señalización (19).

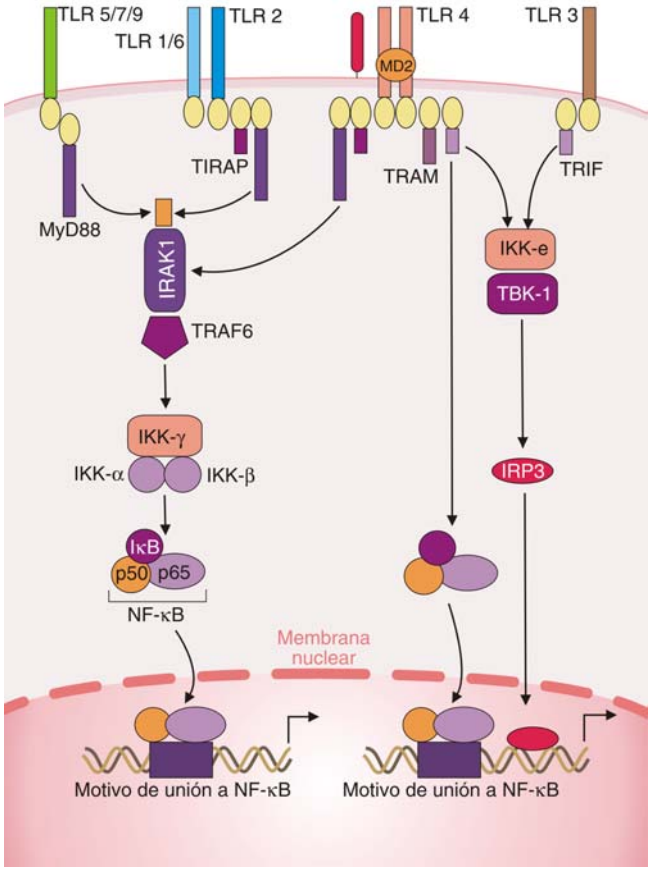
Señalización por los TLRs

Después del reconocimiento de sus ligandos, los TLRs activan las vías de señalización intracelular que conducen a la expresión de citoquinas y moléculas coestimuladoras. Los dominios intracitoplasmáticos de los TLRs (TIR) están asociados a una molécula adaptadora denominada MyD88 que secuencialmente activa la kinasa asociada al receptor de la interleuquina 1 (IRAK) y después a TRAF6 que, a su vez, activa a la kinasa del complejo I-kB. La fosforilación de I-kB induce su degradación y liberación de NF-kB. Adicional a la activación de NF-kB, otras vías como aquellas dependientes de las MAPKs son también activadas.

Observaciones en ratones deficientes en MyD88 evidenciaron que aún en ausencia de MyD88 se obtiene respuesta, medida por la activación de NF-kB y MAPKs, pero con cinéticas retardadas. Estos hallazgos han permitido clarificar que existen, hasta ahora, dos vías de activación por los TLRs, una dependiente de MyD88 y otra independiente (20). Esta última es dependiente de la proteína adaptadora que contiene dominios TIR (TIRAP) o proteína adaptadora tipo MyD88 (MAL), que está asociada con TLR4 y está involucrada en la transmisión de señales independientes de MyD88 (Figura 4) (21,22).

Las señales de los TLRs difieren entre los miembros de la familia. Por ejemplo, la señal a través de TLR9 induce efectos similares a los de TLR4, como regulación positiva de la expresión de moléculas coestimuladoras y de citoquinas. Sin embargo, diferente de TLR4, todos los efectos inducidos por TLR9, hasta donde se conoce hoy, son dependientes de MyD88 (23). Estos resultados indican que TLR4 y TLR9 pueden activar distintos mecanismos de señalización que conducen a efectos biológicos similares. El hecho de que TIRAP/MAL se encuentre asociado con TLR4, pero no con TLR9, puede explicar la incapacidad de TLR9 para inducir señales independientes de MyD88 (21).

FIGURA 4.
Mecanismos de señalización para los diferentes TLR.



Ligando de los TLR9 (secuencias CpG)

Una cepa de *Mycobacterium bovis*, el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), se ha conocido ampliamente como adyuvante en la inducción de la inmunidad celular. A mediados de los años 80s se encontró que el DNA derivado del BCG contribuía a la actividad inmunoestimuladora. Se demostró también que el DNA inhibía el crecimiento de tumores, aumentaba la actividad de las células NK e inducía la producción de interferones por los linfocitos (24). Mediante la utilización de oligonucleótidos sintéticos se encontró que los motivos no metilados de citosinas y guaninas (CpG) eran los responsables de estas actividades inmunológicas. Se observó también que estos motivos eran capaces de activar las células B. Los motivos CpG son escasos y, en los vertebrados, la mayoría son metilados, lo que les hace perder su actividad inmunoestimuladora. Por lo tanto, el DNA que contiene estos motivos CpG no metilados es considerado un PAMP.

Las secuencias CpG con actividades inmunoestimulantes varían de especie a especie; así, las secuencias CpG

inmunoestimuladoras de los ratones difieren de las de los humanos. La secuencia óptima en el ratón consiste de dos purinas hacia 5' y dos pirimidinas hacia 3'. Por su parte, la secuencia óptima en el humano y en ciertas otras especies es TCGTT y/o TCGTA (26).

La exposición de las diferentes CPA a secuencias CpG, en general induce mayor capacitación en su función de presentación antigénica. Por ejemplo, en las células dendríticas las secuencias con oligodeoxinucleótidos (ODN) tipo CpG inducen maduración, un incremento transitorio en el procesamiento de antígenos y en la vida media de los complejos MHC clase II-péptido, con la consecuente presentación antigénica sostenida. Los mecanismos de presentación que requieren moléculas MHC clase II recién sintetizadas se pierden, pero persiste la función de presentación antigénica, ya que la célula dendrítica madura recicla sus moléculas clase II (26). En células dendríticas primarias aisladas de sangre humana, la inducción de la sobrevida, maduración (medida como expresión de CD83 y expresión de las MHC clase II, CD40, CD54 y CD86) fue superior con la estimulación con CpG, que con el estímulo con factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF). Comparado con el estímulo con GM-CSF, las células dendríticas tratadas con CpG mostraron aumento de actividad funcional en el cultivo mixto de linfocitos e indujeron a las células T a aumentar la secreción de citoquinas Th1. Estos hallazgos demuestran la habilidad de las secuencias CpG para activar las células dendríticas y promover la respuesta tipo Th1 (27). En un modelo experimental de ratones, la inyección de CpG-DNA condujo al desarrollo de una linfadenopatía local, caracterizada por el mantenimiento de la composición celular con tendencia a una población predominante de células dendríticas. Se observó, además, que estas células y las células T presentaban una producción local sostenida de IL-12 e IFNγ. La inyección de CpG generó predisposición local para una respuesta de linfotoxicidad celular (CTL) intensa, una respuesta de tipo Th1. En células B de origen tumoral, los CpG ODN, pero no los de control (non-CpG ODN), incrementaron la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, CD54) y aumentaron la expresión de moléculas MHC clase I y II (28).

Adicionalmente, el tratamiento de macrófagos con CpG ODN disminuyó la expresión en superficie de las MHC clase II, evaluadas por citometría de flujo. Además, el análisis con Northern-Blot reveló que el tratamiento con CpG ODN disminuía el mRNA para I-A^k. Después del tratamiento con CpG ODN no se observó, en ningún momento, aumento en el procesamiento del antígeno por parte del macrófago, contrastando con los estudios en células dendríticas. Así, la exposición de macrófagos a CpG resulta en una disminución del procesamiento y presentación del antígeno, lo cual se debe en gran parte a una reducción en la síntesis de los MHC clase II (29).

Una explicación para estos resultados sería un modelo en el cual CpG DNA activa diferencialmente a las células y no induce una regulación positiva de la presentación antigénica por los macrófagos, pero sí la aumenta en otras células presentadoras de antígeno como células B y dendríticas.

TLR-9

Se reconoce TLR9 como el receptor específico de las secuencias CpG (30). La evaluación de los ratones deficientes en TLR9 ha mostrado que son incapaces de responder a los CpG, ya que éstos no inducen producción de citoquinas por los macrófagos, los linfocitos B no proliferan y no se induce maduración de las células dendríticas, lo cual evidencia la función esencial del TLR9 en la respuesta inducida por las secuencias CpG (9).

La activación de TLR9 por los oligonucleótidos que contienen motivos CpG requiere la internalización de los CpG hacia los endosomas, los cuales requieren, a su vez, madurar y acidificarse para de esta forma permitir el inicio de las señales de TLR9, sugiriendo la especificidad de la interacción entre TLR9 y su respectivo ligando y estableciendo que la expresión de TLR9 es endosomal (31,32).

No todas las secuencias CpG inducen patrones iguales de activación en los diferentes tipos celulares, quizás por formar heterodímeros con otros TLR o por interacciones con otros PRRs (33).

La expresión de TLR9 difiere entre especies. En el ratón las células del sistema inmune de línea mieloide (incluyendo monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides) expresan TLR9 y responden a la estimulación. En los humanos las evidencias existentes son controversiales. Estudios que han evaluado la expresión de TLR9 mediante RT-PCR evidenciaron mRNA de TLR9 en todos los grupos celulares de líneas linfoides o mieloides pero se mostró también una expresión diferencial (34). Nosotros hemos observado, la expresión de TLR9 en monocitos (CD14+), linfocitos B (CD19+) y células dendríticas monocitoides (BDCA3+). Estos hallazgos, aunque similares a otros reportados, difieren en el hallazgo de expresión de TLR9 en células dendríticas de origen mieloide como las BDCA3+.

La interacción TLR9-CpG como mecanismo de inicio o persistencia de la autoinmunidad

Utilizando la línea celular AM14 derivada del ratón transgénico para el receptor de células B con especificidad de factor reumatoide (FR), se demostró una mayor activación de estas células en presencia de anticuerpos dirigidos contra el nucleosoma (IgG2a $^{a/j}$ antinucleosoma). Como se dijo previamente, las secuencias hipometiladas de DNA son comunes en el DNA bacteriano. Secuencias CpG hipometiladas están también presentes, aunque en baja cantidad, en el DNA de mamíferos. Como la cromatina unida a los anticuerpos es parte del complejo que estimula las células AM14, el TLR9 podría ser un buen candidato para ser un segundo receptor. Una característica única de la señal por TLR9 es la dependencia del pro-

cesamiento endolisosomal, reflejado por la sensibilidad a la señalización de TLR9 a la cloroquina y otros inhibidores de la acidificación endosomal. La activación de las células AM14 (RF + célula B) por los complejos inmunes que contienen anticuerpos anticromatina fue bloqueada por cloroquina, indicando que el TLR9 es el TLR responsable de amplificar la señal del receptor de las células B en esta línea celular (35,36). La estimulación por ambos, CpG y complejos inmunes anticromatina, puede ser explicada por un acoplamiento múltiple y secuencial (Figura 5).

Secuencias CpG y autoinmunidad

Los ODNs contienen secuencias CpG semejantes a aquellas encontradas en los DNA bacterianos, con iguales acciones inmunoestimuladoras (37). Estos ODNs poseen varios usos potenciales en terapéutica. El fin es inducir una respuesta de inmunidad innata adecuada que permita al huésped protegerse de algunas enfermedades infecciosas, actuar como adyuvante y mejorar la función de las CPAs promoviendo la inducción de una respuesta inmune adaptativa específica. Adicionalmente, puede ayudar en la prevención de alergias al inducir una respuesta de tipo Th1 más que Th2. Los ODNs tipo CpGs, además, están siendo evaluados como inmunoterapia para cáncer, incluyendo hipernefroma, tumores de piel, cáncer de mama, útero y del sistema inmune (25).

Existen algunas preocupaciones con respecto a la seguridad del uso clínico de los ODNs tipo CpG. Entre ellas se incluyen la posibilidad de que los ODN puedan aumentar la inmunogenicidad a proteínas propias y disparar, eventualmente, el desarrollo de autoinmunidad órgano específica o sistémica.

La capacidad de los CpG de inducir enfermedades autoinmunes (EAI) está basada en estudios murinos donde se evidencia que altas dosis de DNA bacterianos inducen la producción de autoanticuerpos contra el DNA de doble cadena y acelera la producción de autoanticuerpos en los ratones *susceptibles a lupus*. Además, el DNA bacteriano estimula la producción de IL-6 y bloquea la apoptosis de linfocitos activados, funciones que predisponen al desarrollo de EAI por facilitar la persistencia de linfocitos autorreactivos.

Con el fin de clarificar el riesgo de los CpG para inducir autoinmunidad, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* inyectando en ratones, dosis repetidas e inmunoestimuladoras de DNA tipo CpG. Aunque el número de células B que producían anticuerpos anti-DNA incrementó 2-3 veces y los títulos de anticuerpos anti-DNA se elevaron un 60%, la magnitud de los efectos fue insuficiente para inducir un empeoramiento de la autoinmunidad sistémica (25).

En el caso de autoinmunidad órgano específica la situación es más compleja ya que en estas entidades se observa la participación de una respuesta Th1, la cual es típicamente inducida por los DNA tipo CpG. En un modelo murino de encefalomielitis alérgica experimental dependiente de IL-12 (semejante a la esclerosis múltiple), los animales tratados con DNA tipo CpG y posteriormente retados con un antígeno, desarrollaron células Th1 efectoras que causaron la enfermedad. Por su parte, los ratones retados sólo con el antígeno, en ausencia de secuencias CpG, no presentaron enfermedad.

En un modelo de "semejanza molecular", la coadministración de antígenos derivados de *Chlamydia* y CpG

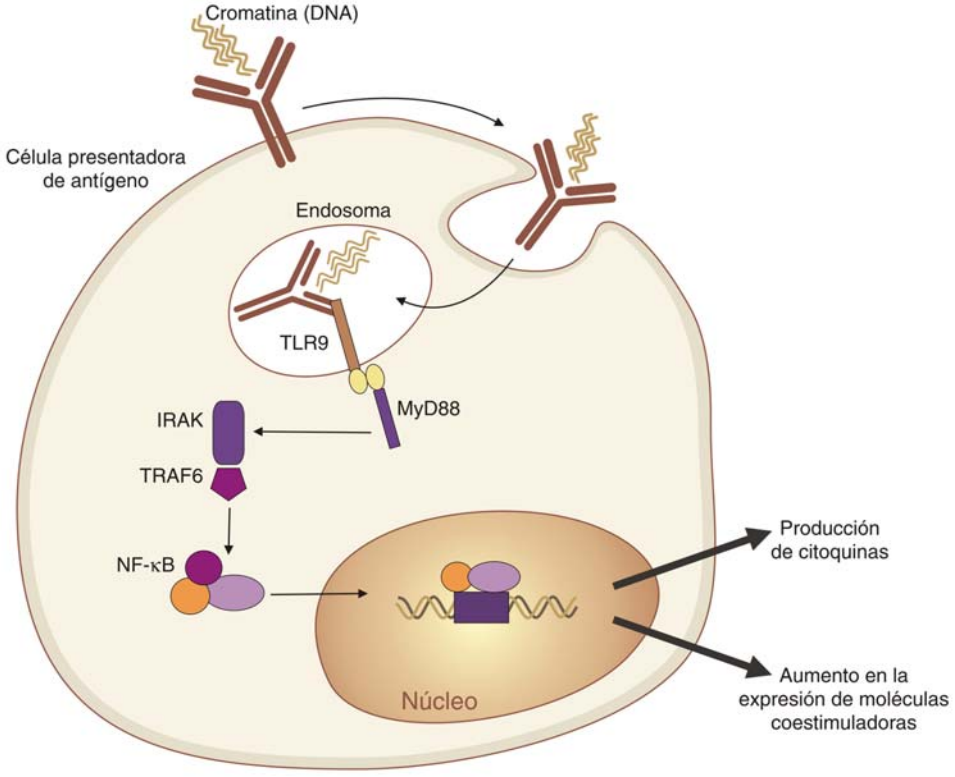


FIGURA 5.
Efectos de la interacción de auto-anticuerpos contra la cromatina y TLR-9.

indujo miocarditis autoinmune. Igualmente, la presencia de CpG incrementa la susceptibilidad de los ratones a desarrollar artritis. Todas estas evidencias indican que las secuencias CpG pueden promover el desarrollo de autoinmunidad bajo ciertas circunstancias (25).

TLR9 y Lupus Eritematoso Sistémico

La premisa de que ligandos endogenos se unan a algún miembro de la familia de los TLR puede ser un evento fundamental en la activación de las células B autorreactivas. En circunstancias normales, las células B específicas contra cromatina permanecerían quiescentes. Sin embargo, algún evento podría incrementar la posibilidad de que esta cromatina se tornara inmunoestimuladora.

Los eventos que pudieran ocurrir serían: defectos en la remoción de la cromatina, alteraciones en los patrones de metilación del DNA, que en algunos casos es el resultado de la utilización de medicamentos asociados a la inducción de LES; y el tercer y último evento que pudiera ocurrir es que se facilite el acceso de los complejos inmunes que contienen nucleosomas permitiendo la interacción con el TLR9, inducción de señales y activación de las células del sistema inmune (35,36)

TLR2 y artritis reumatoide

Se ha descrito un aumento en la expresión de TLR2 en la sinovial de pacientes con artritis reumatoide, igualmente en los sinoviocitos tipo fibroblastos (FLS). Cultivos con estos FLS demostraron que responden a proteoglicanos con el aumento en la expresión de integrinas, citoquinas y metaloproteinasas. Este tipo de respuesta no se observó cuando se utilizó como estímulo CpG. La utilización de anti-TLR2 bloqueó la señal inducida por los proteoglicanos, hallazgo que refuerza la participación de TLR2 en la activación de los FLS por proteoglicanos. Se conoce además que citoquinas que participan en la patogénesis de la artritis reumatoidea como IL-1 y TNFα inducen la expresión de TLR2 (38,39).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Colciencias (1115-04-12938).

Referencias

1. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 2002; 296:298-300
2. Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. Clin Microbiol Rev 2003; 4:637-46
3. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spÃ¤tzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 1996; 86:973-83
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001; 2:675-80
5. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:588-93
6. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity 1999; 11:443-51
7. Du X, Poltorak A, Wei Y, et al. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 2000; 11:362-71
8. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. Biochem Biophys Acta 2001; 1518:157-61
9. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000; 408:740-5
10. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science 2004; 303:1522-6
11. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med 1999; 189:1777-82
12. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. Science 1999; 285:736-9
13. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 2001; 410:10099-103
14. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:9237-42
15. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol 2000; 164:558-61
16. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2001; 276:10229-33
17. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. J Biol Chem 2001; 276:5197-203
18. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:13766-71
19. Sabroe I, Read RC, Whyte MK, et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. J Immunol 2003; 171:1630-5
20. Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. C R Biol 2004; 327:581-9
21. Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:12654-8
22. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature 2001; 413:78-83
23. Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. Trends Immunol 2001; 22:78-83
24. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. J Natl Cancer Inst 1984; 72:955-62.
25. Klinman DM, Currie D, Gursel I, et al. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. Immunol Rev 2004; 199:201-16
26. Askew D, Chu RS, Krieg AM, et al. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. J Immunol 2000; 165:6889-95
27. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:9305-10
28. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. J Leukoc Biol 2001; 69:81-8
29. Chu RS, Askew D, Noss EH, et al. CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing. J Immunol 1999 163:1188-94
30. Hacker H, Mischak H, Hacker G, et al. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. EMBO J 1999; 18:6973-82
31. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, et al. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. Eur J Immunol 2002; 32:1958-68
32. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol 2004 5:190-8
33. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, et al. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. J Immunol 2001; 166:2372-7

34. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol 2002; 168:4531-37
35. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature 2002; 416:603-7
36. Marshak-Rothstein A, Busconi L, Lau CM, et al. Comparison of CpG s-ODNs, chromatin immune complexes, and dsDNA fragment immune complexes in the TLR9-dependent activation of rheumatoid factor B cells. J Endotoxin Res 2004;10:247-51
37. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. Microbiol Immunol 1992; 36:983-97
38. Kyburz D, Rethage J, Seibl R, et al. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. Arthritis Rheum 2003; 48:642-50
39. Seibl R, Birchler T, Loeliger S, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. Am J Pathol 2003; 162:1221-7

4

COMPLEMENTO

Erika Caro

El sistema del complemento, está constituido por más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana, y representa uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad innata y la humoral. Es activado por tres vías: la clásica, la alterna y la vía de las lectinas, las cuales convergen en la activación del componente central del complemento, el factor C3, y conducen a la formación del complejo citolítico de ataque a la membrana. El objetivo básico del sistema es lograr la deposición de fragmentos del complemento sobre blancos patológicos para la opsonización, lisis y la liberación de péptidos que promuevan la respuesta inflamatoria, así como servir de vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa. El complemento es un mediador crítico en los procesos inflamatorios y puede contribuir significativamente al daño tisular observado en diversas condiciones clínicas, por ello su activación se encuentra estrictamente regulada. La deficiencia de factores del complemento se asocia con un incremento en la susceptibilidad a infecciones y al desarrollo de enfermedades autoinmunes cuando se ven afectados algunos de los componentes de la vía clásica.

Contenido

Activación
Regulación
Funciones del sistema del complemento
Deficiencias de los factores del complemento
El sistema del complemento como blanco terapéutico
Complemento y autoinmunidad

Introducción

El sistema del complemento parece haberse establecido a partir de los vertebrados mandíbulados; evidencias recientes indican que los componentes de este sistema en los peces óseos y cartilaginosos son los mismos que en los mamíferos, y que éste corresponde a uno de los sistemas mejor organizados y conservados de la inmunidad innata.

En los humanos, en un comienzo fue identificado como un componente termolábil del suero que complementaba la acción de los anticuerpos sobre la muerte de las bacterias. El complemento hace parte de la inmunidad innata y representa uno los principales mecanismos efectores en la inmunidad mediada por anticuerpos. En el presente se estima que el sistema del complemento está compuesto por, aproximadamente, 35 proteínas solubles y de membrana, las cuales interactúan para reconocer, opsonizar y eliminar microorganismos invasores o células alteradas (Tabla 1). Las proteínas solubles del complemento repre-

Tabla 1. Componentes plasmáticos de la cascada del complemento.

Componente	Peso molecular (kD)	Concentración sérica (ug/ml)	Producto de activación	Comentarios y función
Vía clásica				
C1	900			Inicia activación de la vía clásica
C1q	410	75		Se une a la porción Fc de las Ig
C1r	85	50	C1r	Proteasa sérica que fracciona C1s
C1s	85	50	C1s	Proteasa sérica que fracciona C4 y C2
C4	210	200-500	C4a-C4b	Anafilotoxina
C2	110	20	C2a-C2b	Proteasa sérica, hace parte de C3 y C5
Vía alterna				
Factor B	93	200	Ba-Bb	Proteasa sérica, hace parte de C3 y C5
Factor D	25	1-2	D	Proteasa no activa que fragmenta el factor B
C3	195	550-1200	C3a-C3b	Anafilotoxina y opsonina, hace parte de las proteasas C3 y C5
Properdina	220	25		Estabiliza el C3 en la vía alterna
Efectores comunes				
C5	190	70	C5a-C5b	Anafilotoxina que inicia la formación del CAM
C6	128	60		Componente del CAM
C7	121	60		Componente del CAM
C8	155	60		Componente del CAM
C9	79	60		Componente del CAM
Proteínas solubles que regulan la activación del complemento				
C1-Inhibidor	110	200	C1r, C1s	Previene activación espontánea
C4bp	500	250	C4b	Acelera la disociación de la C3 convertasa de la vía clásica
Factor H	150	480	C3b	Acelera la disociación de C3 convertasa en la vía alterna
Factor I	88	35	C4b y C3b	Corta C4b y C3b
Proteína S	83	505	C5b-7	Previene la inserción del CAM
Sp40, 40	80	50	C5b-9	Modula la formación del CAM
Properdina	220	20	C3bBb	Estabiliza la convertasa en la vía alterna

Proteínas de membrana celular que regulan la activación del complemento				
Proteína	PM	Distribución celular	Interactúa con	Función
Receptor tipo 1	190-280	Eritrocitos, leucocitos, miocitos	C3b, C4b, IC3b	Promueve la eliminación de complejos circulantes. Es cofactor del factor I para fragmentar C3b y C4b. Acelera la disociación de C3 y C5
PCM	45-70	Linfocitos, monocitos, neutrofilos, célula endotelial, fibroblastos y miocitos	C3b, C4b	Cofactor del factor I para fragmentar C3b y C4b.
DAF	70	Eritrocitos, leucocitos, plaquetas y miocitos	C4b2a, C3bBb	Acelera la disociación de C3. Previene la asociación del C3b con el factor B, C4b y C2
HRF	65	Eritrocitos, leucocitos, plaquetas y miocitos	C8, C9	Interviene en la unión de C8 y C9 para evitar la formación del CAM.

CAM: Complejo citolítico de ataque a membrana, Ig: Inmunoglobulina, kD: kiloDalton, PCM: proteína cofactora de membrana, DAF: factor acelerador de disociación, HRF: factor homólogo de restricción.
Adaptada de Yamamoto I, et al. Rev Ass Med Brasil, 2001.

sentan más de 3 gramos por litro, es decir, hasta el 5% de las proteínas plasmáticas totales.

La mayoría de las proteínas del complemento se sintetizan en los hepatocitos; sin embargo, existen otras proteínas que son producidas principalmente a nivel extrahepático, como C1q, C7 y el factor D. Es así como las células dendríticas inmaduras y los macrófagos constituyen una fuente importante de C1q. En algunos órganos como el riñón, la síntesis de factores del complemento por células residentes o del infiltrado tisular es crítica para el inicio y mantenimiento de procesos inflamatorios crónicos.

El objetivo básico del sistema es lograr la deposición de fragmentos del complemento sobre blancos patológicos para la opsonización, lisis y liberación de péptidos que promuevan la respuesta inflamatoria, adicionalmente, éste participa en la regeneración y reparación fisiológica de los tejidos. A grandes rasgos el complemento desempeña tres funciones fisiológicas: a) defensa contra las infecciones, b) puente entre la inmunidad innata y adaptativa, y c) disposición final de desechos de procesos tisulares e inflamatorios (Tabla 2).

El complemento es un sistema que se activa por la acción de una cascada proteolítica limitada, donde un componente cliva al siguiente activándolo y generando una amplificación dramática. La activación del complemento es, en potencia, nociva por lo tanto está estrictamente regulada.

La nomenclatura asignada a cada uno de sus componentes sigue el orden histórico en el cual se descubrieron las proteínas. Los fragmentos generados durante el proceso de activación se nombran acompañándolos de una letra, generalmente el de mayor tamaño se denomina "b" y el de menor tamaño "a", excepto para el componente C2, donde C2a representa el fragmento grande y C2b el pequeño.

Activación

La activación del sistema del complemento es un fenómeno redundante, en el cual intervienen enzimas tipo proteasas de serina, existen diferentes vías que convergen en la activación de su componente central C3. La vía terminal de activación del complemento conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM), un sistema único que permite ensamblar, a partir de proteínas plasmáticas, un complejo lipofílico capaz de insertarse en las membranas celulares de microorganismos y otras células blanco.

El sistema del complemento posee tres vías de activación: la clásica, la de las lectinas y la alterna, cuyo objetivo común es promover la inflamación, la eliminación de

Tabla 2. Actividades fisiológicas del sistema del complemento.

Actividad	Proteína responsable
Defensa contra infección	
Opsonización	Unión de fragmentos C3 y C4
Quimiotaxis y activación de leucocitos	Anafilotoxinas C5a, C3a y C4a
Lisis de bacterias y células	CAM (C5b-C9)
Interfase entre inmunidad innata y adquirida	C3 se une al BCR y a CPA, C3b y C4b une complejos inmunes
Aumento de la respuesta de anticuerpos	C3b y C4b une complejos inmunes, C3 se une al receptor en el folículo de la CPA
Potenciación de la memoria inmunológica	C3b y C4b se unen a complejos inmunes y al antígeno, C3 en receptores de células dendríticas foliculares
Desecho y limpieza	
Limpieza de complejos inmunes en los tejidos	C1q: uniones covalentes de fragmentos de C3 y C4
Limpieza de células apotóticas	C1q: uniones covalentes de fragmentos de C3 y C4

BCR: receptor de linfocitos B. CPA: Célula presentadora de antígenos.

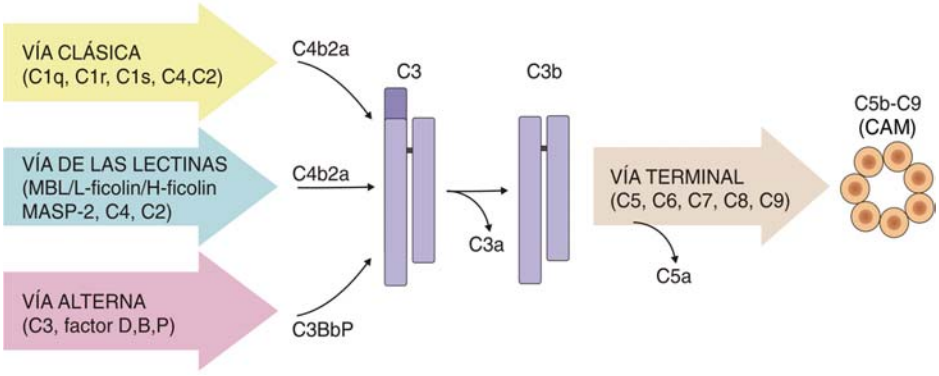


Figura 1.
Vías del complemento.
La gráfica muestra los factores principales que conforman cada una de las vías del complemento y su convergencia para formar finalmente el complejo de ataque a membrana (CAM).

patógenos o desechos de procesos tisulares o inflamatorios y el fortalecimiento de la respuesta inmune (Figura 1, Tabla 3).

El factor C3 es su componente central que posee un enlace tiol-ester intramolecular. Posterior a su activación es expuesto a la superficie permitiéndole formar enlaces covalentes con grupos hidroxilo o amino en la superficie del blanco, sin involucrar el reconocimiento de moléculas específicas, lo que le confiere propiedades únicas (Figura 2).

Las vías clásica y de las lectinas, conducen a la activación de proteasas de serina que actúan sobre C2 y C4, llevando a la formación de una de las convertasas de C3, compuesta por C4bC2a, la cual a su vez cliva a C3 generando C3a y C3b. C3b es un componente multifuncional que puede unirse a diferentes superficies a través de una reacción de transesterificación entre los grupos amino e hidroxilo ubicados en la superficie blanco y su enlace tiol-ester interno. El C3b inmovilizado y su producto inactivado iC3b actúan como opsoninas para las células fagocíticas, promoviendo la interacción a través de sus receptores CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18). La unión de una molécula extra de C3b a la convertasa de C3 lleva a la formación de C4bC2aC3b o la convertasa de C5, el fragmento C5b generado por esta convertasa inicia el ensamblaje del CAM, conformado por C5 a C9. Los factores C6 y C7 se unen a la membrana donde subsecuentemente se acoplan C8 y múltiples moléculas de C9 (poli C9), una vez ensamblado el CAM forma poros en las bicapas lipídicas de sus células blanco a las cuales puede causar lisis.

Tabla 3. Iniciadores de las tres vías de activación del complemento.

Vías	Iniciadores
Clásica	Complejos inmunes Células apoptóticas Algunos virus y bacterias gram-negativas Proteína C reactiva, unida a su ligando
Lectinas	Microorganismos con grupos manosa terminales
Alterna	Bacterias, hongos, virus y células tumorales

La molécula que reconoce patrones en la vía clásica es C1q, ésta circula acompañada por dos proenzimas, C1r y C1s, formando el complejo de C1 ($C1qr_2s_2$). El C1q se une a una amplia gama de patrones de carga y de hidrofobicidad, además de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Ig) presentes en complejos inmunes antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Las inmunoglobulinas humanas que inician la vía clásica son IgG1, IgG2, IgG3 e IgM, donde un subgrupo de esta última, denominado anticuerpos naturales, tiene un papel primordial.

La unión del complejo C1 a su blanco induce un cambio conformacional y la autoactivación de C1r, el cual luego cliva y activa a C1s para que actúe sobre C2 y C4.

Existen evidencias que indican que el sistema del complemento se originó como un sistema de opsonización basado en lectinas. La principal proteína de reconocimiento en la vía de las lectinas es la proteína de unión a manosa (MBL), una lectina tipo C que interactúa con azúcares neutros como manosa y N-acetil-glucosamina, ésta interactúa con las proteasas de serina asociadas a MBL (MASP1, 2 y 3) para activar el complemento.

La vía de las lectinas se inicia con la unión de MBL a residuos de carbohidratos en la superficie de una amplia gama de microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos. La MBL también reconoce residuos de carbohidratos en moléculas de Ig, incluyendo la variante común de glicosilación de la IgG, IgG-G0, así como la IgA polimérica. La MBL circula en un complejo con las MASP y una proteína de 19 kDa denominada MAp19 (producto del "splicing" alternativo de MASP2). La MASP2 es responsable de la activación del complemento por esta vía al clivar a C2 y C4, se considera equivalente a C1s. El papel de otras MASP no es bien conocido, aunque se ha reportado que la MASP1 podría activar directamente a C3.

Las MASP también interactúan con las ficolinas, un grupo de proteínas de reconocimiento y/o activación del sistema del complemento descubiertas hace poco, y cuya estructura es similar al C1q y la MBL. Al presente se han descubierto 3 ficolinas en humanos, las ficolinas L y H se encuentran en el suero mientras la M está presente en la superficie de monocitos circulantes, las ficolinas, reconocen N-acetil-glucosamina pero no manosa.

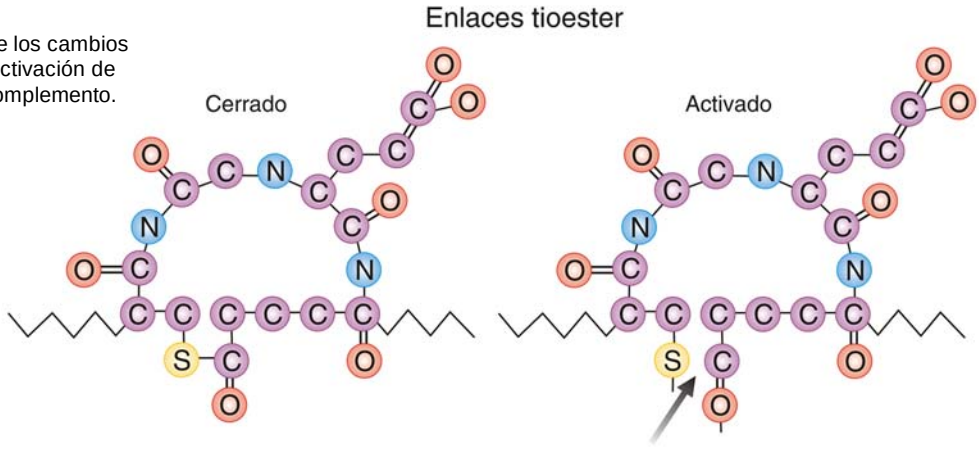


Figura 2.
Diagrama estructural de los cambios generados durante la activación de algunos factores del Complemento.

Las ficolinas L y H actúan como opsoninas para *Salmonella typhimuriun* y *Escherichia coli*, y se ha reportado que la ficolina L puede activar el complemento.

La vía alterna es activada por un mecanismo muy diferente, ésta vía reconoce superficies ricas en residuos de azúcares neutros y cargados. En la vía alterna hay un proceso de activación espontánea y continua a pequeña escala, denominado "tickover", donde el C3 sufre hidrólisis de su enlace tiol-éster interno para formar C3i (o $C_3(H_2O)$). El C3i forma un complejo con el factor B, C3iB, este último es clivado por el factor D para formar C3iBb, la porción Bb del complejo posee actividad de proteasa de serina y cliva más C3 generando C3b y C3a. El C3b puede unirse al azar y en forma covalente a cualquier superficie celular o macromolecular, una vez depositado, éste puede unir más factor B, el cual es clivado por el factor D para formar el complejo C3bBb o la covertasa alterna de C3, este complejo es estabilizado por la properdina. Si otra molécula de C3b se une a esta convertasa, se obtendrá la convertasa de C5, C3bBbC3b, con su subsecuente activación y el posterior ensamblaje del CAM.

La adherencia de moléculas activas de C3 a una superficie que carece de elementos reguladores del complemento facilita la rápida amplificación de esta vía a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, donde los fragmentos de C3b generados forman más convertasa produciendo más C3b.

Las reacciones enzimáticas secuenciales que llevan al clivaje proteolítico de C3 y C5 generan fragmentos pequeños, C3a y C5a, los cuales actúan como anafilotoxinas que activan las células vecinas para liberar mediadores de la inflamación.

Regulación

Debido a los efectos proinflamatorios y potencialmente deletéreos mediados por el complemento, su activación está estrictamente controlada y sus mecanismos de regulación finamente balanceados, de manera que los productos de su activación se concentren en la superficie blanco y su deposición sobre las células normales y tejidos sea limitada, cuando este sistema se desequilibra el complemento puede contribuir al daño tisular.

El control pasivo de la activación se da gracias a que la vida media de los sitios activos en C4b y C3b es muy corta y a que los complejos multimoleculares que forman las convertasas, C4bC2a y C3bBb, son inherentemente inestables. El control activo involucra la acción de inhibidores e inactivadores, de hecho cerca de la mitad de las proteínas del sistema del complemento están involucradas en mecanismos de regulación. Los reguladores operan a tres niveles (Figura 3):

a. Bloqueando el inicio de la cascada: El inhibidor de C1(C1-Inh), previene la activación crónica y excesiva de las vías clásica y de las lectinas, al bloquear los sitios activos en C1r, C1s y MASP2.
b. Previeniendo la amplificación de las convertasas de C3 y C5: La convertasa de C3 es el principal amplificador de la activación del sistema del complemento para las 3 vías. La regulación de las convertasas es lograda a través de la desestabilización de los complejos enzimáticos por proteínas de membrana como el factor acelerador del catabolismo (DAF), la proteína cofactor de membrana (MCP), el CR1 o el factor de restricción homólogo (HRF); por proteínas plasmáticas como la proteína de unión a C4b (C4BP) y el factor H, así como a través de la degradación proteolítica de fragmentos activos por el factor I.
c. Inhibiendo la formación del CAM: El ensamblaje o la inserción del CAM en la membrana es bloqueado por la asociación física de CD59 con C5-C8 a nivel celular y en el plasma por la proteína S (vitronectina) y la SP-40 (clusterina).

Las proteínas reguladoras como el factor H, MCP, CR1, DAF, HRF y C4BP interactúan con los complejos y promueven su disociación, este tipo de control es denominado aceleración del catabolismo. De las proteasas que con-

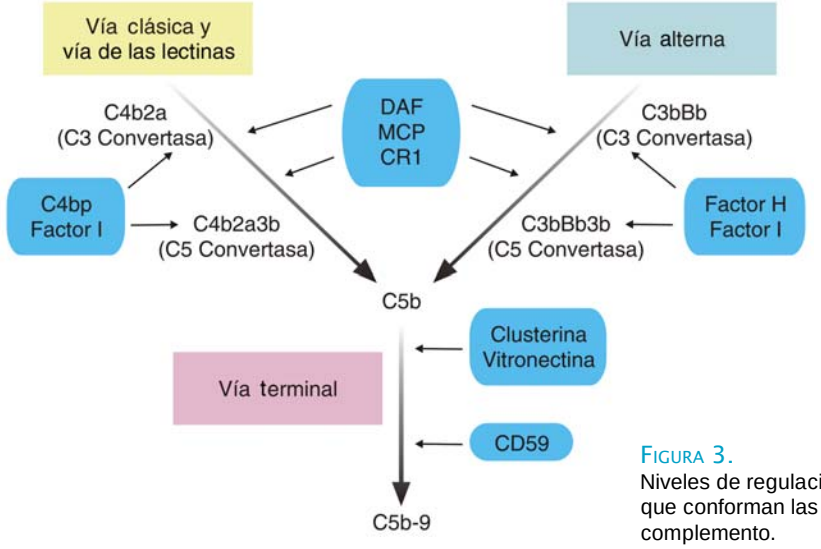


FIGURA 3.
Niveles de regulación de los diferentes factores que conforman las vías clásica y alterna del complemento.

forman el sistema del complemento, los factores D e I no circulan como proenezimas sino como formas activas, éstos no poseen inhibidores naturales y sus sustratos son complejos proteícos transitorios que se forman durante la activación, es decir, que el factor D sólo actúa sobre su sustrato natural; el factor B, cuando forma complejos con el C3, mientras que el factor I sólo ataca a C3b y C4b cuando éstos se acoplan transitoriamente con sus cofactores: factor H, C4BP, CR1 o MCP. Los factores B y C2 tampoco poseen inhibidores naturales y sólo se activan cuando sufren activación proteolítica y están acoplados a C3b o C4b, respectivamente; además, su interacción depende de la concentración de Mg^{+2}. C1r, C1s y las MASP están reguladas en una forma más convencional por el C1-Inh.

Las proteasas del complemento en general tienen una especificidad muy alta y una baja actividad; sin embargo, su activación excesiva es proinflamatoria y causa daño tisular, es por ello que la atención se ha centrado en controlar la formación o la actividad de los complejos de proteasas C3bBb y C4bC2a, ya que éstas promueven la generación de péptidos inflamatorios como C3a y C5a.

El factor H es el principal regulador sérico de vía alterna, es una proteína multifuncional que acelera la inactivación de la convertasa de C3, y puede bloquear su función tanto en fase fluida como sobre las superficies celulares, el DAF y el MCP también pueden regular la actividad de la convertasa de C3 de la vía alterna sobre las membranas celulares.

En las superficies del hospedero y otras superficies protegidas, el C3b depositado puede formar un complejo con el factor H, (o sus homólogos de membrana CR1, MCP, DAF), el C3bH es inactivado hacia iC3b por la proteasa reguladora factor I, con la liberación del factor H, es decir, que si el factor H se une antes que el factor B no hay amplificación del C3b.

La proteína de unión a C4b (C4BP) es un potente inhibidor soluble cuya estructura y función ha empezado a dilucidarse hace poco, es el inhibidor mejor conocido de la vía clásica, y controla las reacciones mediadas por C4b al actuar como un cofactor del factor I en la inactivación proteolítica de C4b y en menor grado de C3b, así como al bloquear el ensamblaje de la convertasa de la vía clásica al interactuar con C4b.

La expresión aumentada de estas proteínas reguladoras en la superficie de células tumorales puede hacerlas refractarias a la acción del complemento.

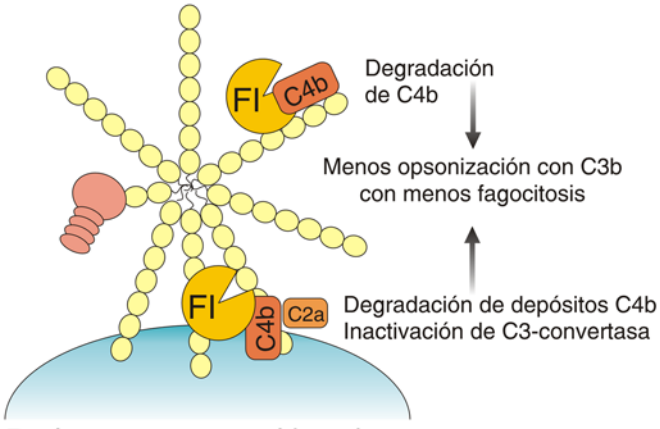
Funciones del sistema del complemento

Complemento e infección

Una de las principales funciones del complemento es su capacidad para mediar la eliminación de patógenos, es así como el CAM puede formar lesiones en la membrana que conducen a la muerte por la pérdida de componentes citoplasmáticos o alteraciones osmóticas; sin embargo, este complejo sólo es efectivo contra microorganismos cuyas membranas citoplasmáticas no están protegidas por paredes celulares, en cuyo caso el mecanismo efector más importante del complemento es la opsonización con fragmentos de la proteína C3. Los patógenos que activan el complemento en principio son recubiertos por el fragmento C3b, el cual prontamente es inactivado por el factor I, iC3b que es una potente opsonina, es reconocido por los receptores CR3 y CR4 en las células fagocíticas, esta interacción conlleva a cambios a nivel del citoesqueleto y a la internalización del microorganismo. Cabe recordar que la fagocitosis mediada por factores y receptores del complemento, aunque es inespecífica, puede ser crucial para el inicio de la respuesta inmune innata y el desarrollo de la inmunidad adaptativa, ya que sus productos de activación pueden promover la respuesta inflamatoria local y modular la producción de anticuerpos específicos.

Bajo condiciones fisiológicas el complemento también promueve la remoción de complejos inmunes, lo cual constituye un mecanismo para eliminar bacterias cubiertas por anticuerpos, sin embargo, si los complejos inmunes no pueden ser eliminados en forma eficiente el complemento podría activarse en forma crónica generando procesos inflamatorios.

Muchos organismos, por el contrario, toman ventaja del sistema del complemento para incrementar su virulencia; algunas bacterias y virus intracelulares usan sus moléculas reguladoras y receptores para ser internalizados por las células del hospedero (Figura 4, Tabla 4).



Patógeno	Ligando
Streptococcus pyogenes	(Proteínas M)
Bordetella pertusis	(hemaglutinina)
Neisseria gonorrhoeae	(porinas, pili)
Escherichia coli K1	(OmpA)
Candida albicans	(?)
Moraxella catarrhalis	(Usp)
Neisseria meningitides	(porinas)

FIGURA 4.
Factores del complemento que intervienen en la virulencia de algunos patógenos.
Algunos factores del complemento son utilizados por varios microorganismos para aumentar su virulencia y facilitar el ingreso a la célula del hospedero.

Tabla 4. Proteínas del sistema del complemento utilizadas por los microorganismos para ingresar a las células humanas.

Microorganismo	Mecanismo de entrada	Receptor del hospedero	Otros receptores y correceptores	Localización del receptor	Blanco de la infección
Epstein- Barr virus	Glicoproteína 350/220	Receptor Tipo 2	Posible receptor en célula epitelial	Células B	Células B y epiteliales
Virus del sarampión	Hemaglutinina	CD46		Muchas células	Linfocitos, macrófagos, neuronas y células dendríticas
Picornavirus	Cápsula	CD55	Receptor tipo integrinas del Cossiekie y Adenovirus	Muchas células	Tejido linfoide intestinal y otros tejidos
Micobacterium tuberculosis	Depósitos de fragmentos C3	Receptor tipo 3		Macrófagos	Macrófagos
VIH	Depósitos de fragmentos C3	Receptores tipo 1, 2, 3	CD4, CCR5 y CXCR4	Macrófagos y LT CD4, y células dendríticas	LT CD4, macrófagos y células dendríticas
Flavivirus (virus del Nilo)	Depósitos de fragmentos C3	Receptor tipo 3		Macrófagos	Macrófagos y neuronas

Actividad proinflamatoria

El complemento puede funcionar como un mediador proinflamatorio, a través de los péptidos C3a y C5a, los cuales son biológicamente activos y generan eventos inflamatorios como quimiotaxis, degranulación de leucocitos, contracción del músculo liso y aumento en la permeabilidad vascular. Tras la activación dada por estos productos, la respuesta inflamatoria es amplificada por la generación de radicales intermediarios del oxígeno, liberación de metabolitos del ácido araquidónico y citoquinas. Por lo tanto, la sobreactivación del complemento representa un riesgo considerable de daño tisular para el hospedero ya sea directa o indirectamente. La principal función de C5a es la atracción hacia los sitios de inflamación de neutrófilos y monocitos/macrófagos y también puede inducir la formación de TNF-α y PGE-2; por su parte el C3a puede reclutar eosinófilos y mastocitos.

Tolerancia y regulación de la respuesta inmune

La tolerancia inmunológica se refiere a la capacidad para distinguir entre lo propio, lo no propio y lo propio alterado, y es regulada por el sistema inmune adaptativo; sin embargo, cuando hay alteración de los mecanismos reguladores los componentes del sistema inmune innato pueden reaccionar, es por ello que los factores del complemento sólo se depositan sobre células o microorganismos que no poseen suficientes moléculas de control.

Entre el sistema inmune innato y adaptativo existe una importante interrelación. Se ha observado que el sistema del complemento podría estar comprometido tanto en la modulación de la presentación de péptidos antigénicos, dada por la deposición de factores del complemento sobre el elemento blanco, la cual conlleva a un aumento en la fagocitosis, como en la regulación de la respuesta de anticuerpos. El complemento cumple un importante desempeño en la inducción de la respuesta de anticuerpos, gracias a la modulación que sobre la activación de las células B ejercen correceptores del BCR como el CR2 (CD21). Cuando un Ag interactúa con una célula B en presencia de C3d y C3dg, ligandos específicos del CR2, el umbral de activación es menor y se requiere menor cantidad de antígeno para generar una repuesta de anticuerpos, vinculando la activación del complemento con la biología de las células B y el mantenimiento de la tolerancia. El mecanismo exacto a través del cual CR2 tiene un papel en el mantenimiento de la tolerancia en las células B no ha sido todavía esclarecido. Considerando que la coocupación del CR2 y el BCR disminuye el umbral de activación de las células B, una hipótesis sugiere que la coocupación también podría disminuir el umbral para la inducción de tolerancia a autoantígenos; por lo tanto, si la expresión o función del CR2 está afectada, la interacción con el reservorio de antígenos propios, críticos para el mantenimiento de la tolerancia, podría alterarse y facilitar el escape de células B autorreactivas.

El CR2 también podría regular indirectamente la tolerancia de las células B a través de sus efectos sobre las células T. Se ha observado que el CR2 puede mediar la internalización de antígenos T dependientes, dado que la presentación antigénica mediada por CR2 se da en ausencia de estimulación por el BCR, ésta no induciría la expresión de moléculas coestimuladoras, relacionándose con la inducción de la tolerancia en las células T. También se ha planteado que la coocupación del BCR y el CR2 podría alterar los niveles y tipos de moléculas coestimuladoras y favorecer la pérdida de tolerancia, como se ha descrito en los modelos de miocarditis autoinmune. Luego, es posible que bajo ciertos estados de autoinmunidad, el CR2 regule la tolerancia hacia los autoantígenos y en otros induzca la respuesta autoinmune.

Finalmente, se ha propuesto que el C1q y otras opsoninas mantienen la tolerancia y previenen la autoinmunidad al promover la remoción eficiente del material apoptótico y la modulación de la función de los fagocitos.

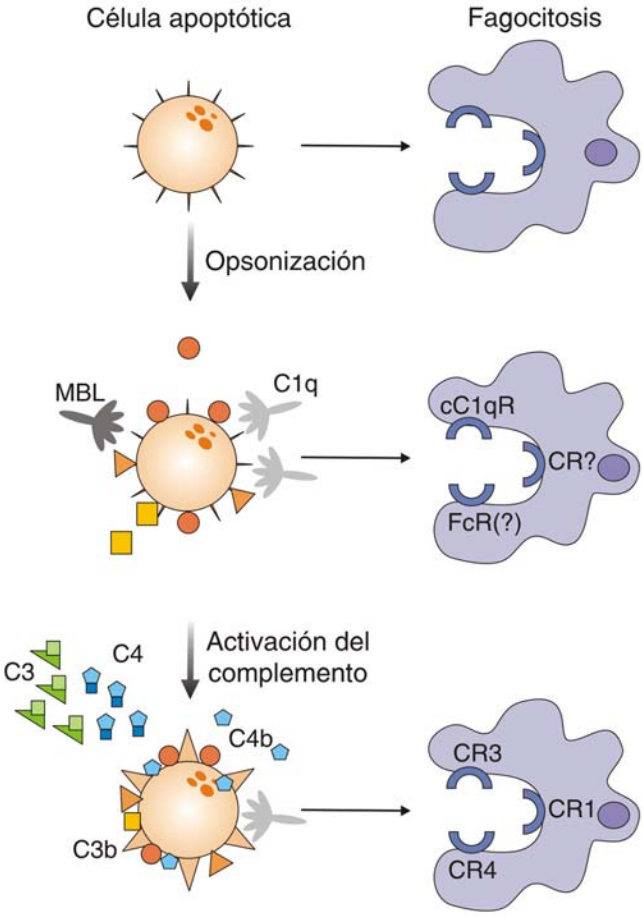


FIGURA 5.
Hipótesis de la eliminación de desechos.
El complemento tiene la capacidad de eliminar complejos inmunes y células apoptóticas, lo que lo convierte en un participante activo de los procesos tanto inflamatorios como antiinflamatorios.

El complemento y la hipótesis de la eliminación de desechos

La hipótesis de la eliminación de desechos plantea las posibilidad de que el complemento posea tanto funciones pro como antiinflamatorias, la última se reflejaría en su rol en la remoción de complejos inmunes circulantes y tisulares, así como de células apotóticas (Figura 5). Si el complemento falla en esta acción, este material, compuesto por citoplasma y núcleos parcialmente degradados, podría acumularse y desencadenar una reacción inflamatoria y/o una respuesta autoinmune. Se ha propuesto que la unión de componentes del complemento como C1q a las células apoptóticas facilitaría su remoción y eliminación; además, la unión de C1q puede activar la vía clásica y mediar la deposición de C4 y C3, ejerciendo un papel directo e indirecto en la remoción de cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas a través de sus receptores calreticulina-CD91, CR3 y CR4, respectivamente. Mientras que se espera que los macrófagos tisulares tengan la capacidad de remover pronto las células apoptóticas, el complemento puede contribuir a eliminar las células muertas en circulación o en sitios de daño tisular extenso, donde la capacidad de los fagocitos se ve disminuida. Los factores del complemento sólo interactúan con las células que están muriendo en la fase tardía de la apoptosis, indicando que éste podría representar un mecanismo de apoyo para la eliminación de células apoptóticas en situaciones de altas tasas locales de apoptosis y baja o alterada capacidad fagocítica.

La remoción de células apoptóticas mediada por factores del complemento, no sólo previene la liberación de sustancias celulares peligrosas, sino que también suprime la inflamación a través de la producción de agentes antiinflamatorios como TGF-β, prostaglandina E_2 y PAF. Se presume que la presentación de Ags derivados de células apoptóticas bajo condiciones no inflamatorias contribuye al mantenimiento de la tolerancia inmunológica; sin embargo, en situaciones de apoptosis masiva que sobrepasen la capacidad de los macrófagos en la remoción de los detritus celulares, las células dendríticas podrían ser reclutadas para su captación, y una vez allí, la persistencia de material apoptótico y de necrosis podría inducir su maduración, la presentación de antígenos intracelulares y por ende el establecimiento de una respuesta inmune frente a estos componentes (Figura 6). Es decir, que la captación de células apoptóticas en un contexto proinflamatorio puede inducir la presentación de autoantígenos y generar un cambio de la inducción de tolerancia hacia la activación. Dado que el lupus eritematoso sistémico (LES) se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que reconocen antígenos nucleares como DNA, RNA y cromatina, los cuales se encuentran presentes en los cuerpos apoptóticos, las células apoptóticas han sido propuestas como fuente de autoantígenos.

La vía alterna también puede participar en la remoción de células apoptóticas, es así como, la unión de iC3b regula negativamente la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-12p70, participando en la remoción silenciosa de detritus celulares por macrófagos y células dendríticas al inducir un fenotipo antiinflamatorio.

Una cuestión clave entonces, es determinar cómo el complemento contribuye al mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios a través de la remoción de células apoptóticas.

Deficiencias de los factores del complemento

Deficiencias genéticas

La mayoría de los componentes del complemento se heredan con un patrón autosómico de codominancia. Componentes de este tipo incluyen C1-Inh, C2, C3, C5, C6, C7 y C9. Los defectos genéticos varían desde cambios en un solo nucleótido que pueden resultar en la generación de proteínas disfuncionales hasta la deleción completa del gen con ausencia de proteína. Al momento se han descrito deficiencias completas para la mayoría de los componentes; la deficiencia de C1-Inh es la única que se

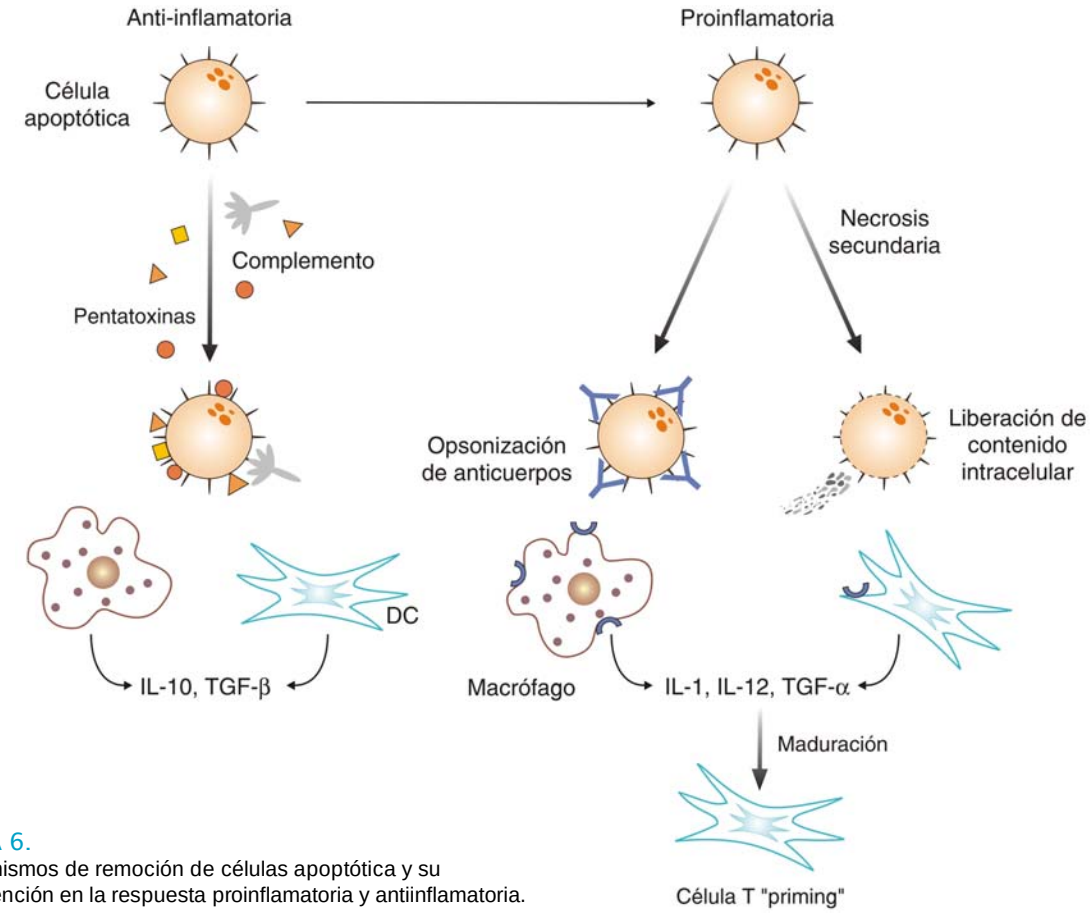


FIGURA 6.
Mecanismos de remoción de células apoptótica y su intervención en la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria.

ha presentado en estado heterocigótico y no se han descrito casos de deficiencia total del factor B o C4BP. La deficiencia de properdina es la única falencia del complemento que está ligada al cromosoma X, de manera que todos los casos citados corresponden al género masculino.

De otro lado, la biología de las deficiencias de C1, C4 y C8, es más compleja, involucrando varios genes para cada componente. El funcionamiento de C1 requiere la presencia de sus 3 subcomponentes C1q, C1r y C1s. En humanos, C4 se da en dos isoformas, C4A y C4B, ambas codificadas por genes diferentes y que están en cantidades iguales de proteína en el 75% de la población normal, la deficiencia de C4A se halla incrementada en pacientes con LES respecto a los controles, 12% vs 3%, respectivamente. El factor C8 corresponde a un heterotrímero, codificado por genes diferentes que requiere de sus tres cadenas para insertarse de manera funcional en el CAM.

La deficiencia de MBL es debida a mutaciones que afectan su oligomerización o la expresión del gen. Análisis recientes han indicado que la vía de activación de las lectinas es muy importante durante el intervalo entre la pérdida de la inmunidad pasiva transmitida por la madre y la adquisición de un repertorio inmunológico maduro.

También se han descrito deficiencias de las proteínas reguladoras del complemento. La deficiencia del factor I, conduce a un consumo exagerado de C3b, y los factores B y H, con la consecuente falencia secundaria de C3 y aumento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas. La regulación defectuosa de C3 por deficiencia del factor H se encuentra asociada con glomerulonefritis, mientras que la deficiencia de DAF y CD59 causan hemoglobinuria paroxística nocturna, la principal manifestación clínica de la deficiencia de C1-Inh es el angioedema hereditario. Aunque son pocos los casos reportados, la deficiencia de CR3 y CR4 se ha asociado con alteraciones de la función leucocitaria (Tabla 5).

La deficiencia total heredada de alguna de las proteínas activadoras del complemento es rara en la población general, se estima que ésta es del orden de 0,03%, esto excluyendo la deficiencia de MBL, la cual puede presentarse en forma homocigótica hasta en un 3% de la población. Sin embargo, las deficiencias del complemento son mucho mayores en poblaciones afectadas por una entidad específica, es así como en pacientes con LES la deficiencia de C2 se acerca al 1%, mientras que en la población general ésta es del 0,009%. En pacientes con infecciones recurrentes por *Neisseria spp.* la incidencia de deficiencias del complemento es hasta del 20%.

Las deficiencias de los primeros componentes de la vía clásica están asociadas a enfermedades por inmunocomplejos o autoinmunes, como glomerulonefritis y LES, respectivamente, mientras que la deficiencia de los componentes opsónicos o del CAM se asocian con infecciones recurrentes.

TABLA 5. Efectos clínicos de las deficiencias heredadas del complemento.

Deficiencia	Efecto sobre la activación del complemento	Asociación clínica
C3	Pérdida de la principal opsonina del complemento y deficiencia en la activación del CAM	Infecciones por bacterias piógenas Glomerulonefritis membranoproliferativa
C3, properdina, proteínas del CAM	Deficiencia en la activación del CAM	Infecciones por *Neisseria* spp.
C1-Inh	Pérdida de la regulación de C1 y deficiencia para activar el sistema de las kalikreinas	Angioedema
CD59	Regulación deficiente de la formación del CAM sobre la membrana de las células propias	Hemólisis, trombosis
Complejo del C1, C4, C2	Deficiencia en la activación de la vía clásica	Lupus eritematoso sistémico
Factor H y factor I	Regulación deficiente de la activación de C3, deficiencia secundaria severa de C3	Síndrome hemolítico-urémico Glomerulonefritis membranoproliferativa Mayor susceptibilidad a infecciones

Deficiencias adquiridas

Se presentan por un desequilibrio en la activación y la síntesis hepática, ocurre en enfermedades autoinmunes, especialmente aquellas caracterizadas por la presencia de complejos inmunes, también puede ser inducida por autoanticuerpos dirigidos contra C1q, C3 o C4, como es el caso del factor nefrítico el cual estabiliza la convertasa de C3. La activación y deficiencia transitoria de factores del complemento puede presentarse en procesos infecciosos severos, quemaduras, isquemia o reacciones a drogas.

Enfermedades asociadas a deficiencias del complemento

Infecciones

La deficiencia de la vía clásica (C1, C4 o C2) se relaciona con infecciones por bacterias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenza* tipo B. La deficiencia de C3, la principal opsonina del sistema del complemento, y la deficiencia de MBL inducen severas infecciones piogénicas recurrentes, mientras que la deficiencia de los componentes del CAM o de la properdina predisponen a las infecciones por *Neisseria spp.*

Enfermedades autoinmunes

Corresponden a la presentación más común de la deficiencia de un componente de la vía clásica, la forma más frecuente es el desarrollo de LES, con una incidencia de la enfermedad del 90%, 75% y 15%, para la deficiencia de C1q, C4 o C2, respectivamente. En los pacientes con LES con deficiencias del complemento, la enfermedad se caracteriza por instaurarse a edad temprana, con notable fotosensibilidad, menor frecuencia de enfermedad renal, títulos variables de anticuerpos antinucleares, y una proporción hombre:mujer afectados casi igual para las deficiencias de C1q y C4.

Enfermedad por deposición de complejos inmunes

El complemento promueve la remoción de antígenos a través de la formación de complejos inmunes, la interacción de C1q, C4b y C3b con los complejos mantiene su solubilidad y facilita su adherencia a las células para su remoción final, como en el caso de los eritrocitos los cuales a través del CR1 reconocen el fragmento C3b en el complejo inmune transportándolo al hígado y el bazo donde serán eliminados por los macrófagos. Si estos complejos no son eliminados en forma apropiada pueden causar procesos inflamatorios como la enfermedad del suero y la crioglobulinemia mixta.

Daño renal

El desarrollo de la enfermedad renal en presencia de procesos autoinmunes ocurre por la deposición de complejos inmunes o la presencia de autoanticuerpos que reaccionan con los componentes del riñón con la subsiguiente activación del complemento, conduciendo a una amplificación excesiva del sistema y al daño tisular, proceso al cual el riñón parece ser particularmente vulnerable.

Síndrome isquemia/reperfusión

La reperfusión del tejido isquémico se asocia con una fuerte reacción inflamatoria que puede generar daño tisular, en el cual las anafilotoxinas derivadas del sistema del complemento, C3a y C5a, parecen estar involucradas como quimioatractantes de neutrófilos.

El sistema del complemento como blanco terapéutico

Además de su contribución en la respuesta inmune innata, se reconoce cada vez más la participación del complemento en la patogénesis del daño tisular por isquemia, inflamación y autoinmunidad, por ello se realizan grandes esfuerzos para identificar cuáles de las más de 30 proteínas, fragmentos de activación y receptores actuarían como mediadores claves, constituyendo un blanco terapéutico en situaciones clínicamente relevantes. La mayoría de estudios se han enfocado sobre el control de la activación de C3 y C5, y así disminuir la generación de los péptidos inflamatorios C3a y C5a, para ello se han usado proteínas recombinantes basadas en los reguladores naturales CR1, y MCP. Otros trabajos han usado anticuerpos y péptidos para inhibir la interacción de C5a con su receptor, aun-

que son pocos los trabajos en los cuales se han utilizado inhibidores de proteasas en el control del complemento; C1-Inh se ha usado por varios años para tratar el angioedema hereditario, actualmente se encuentran en estudio compuestos para inhibir C1s y las convertasas de C3. También se ha planteado la necesidad de desarrollar estrategias que faciliten el mantenimiento de los niveles de algunos factores del complemento en un rango fisiológico, por ejemplo, C1q sería relevante en los pacientes con LES considerando el papel central que éste cumple en la eliminación de detritus celulares y complejos inmunes.

Complemento y autoinmunidad

Se han propuesto varias teorías para explicar la asociación entre las deficiencias de factores del complemento y enfermedades autoinmunes, la mayoría apuntan hacia la incapacidad para eliminar complejos inmunes en ausencia de niveles normales del complemento. El exceso de complejos immunes se depositaría en los tejidos generando inflamación, daño tisular y liberación de autoantígenos que pueden iniciar una respuesta autoinmune, en forma parelela la presencia de altas concentraciones de células apoptóticas debida a una pobre eliminación puede ser suficiente para generar una respuesta autoinmune. La opsonización de cuerpos apoptóticos por factores del complemento como C1q y C3b facilita su captación por macrófagos y asegura su remoción en ausencia de una repuesta inflamatoria, tal y como se ha comprobado en la zona marginal del bazo donde la fagocitosis de cuerpos apoptóticos opsonizados con complemento por macrófagos y células dendríticas induce una disminución en la expresión del mRNA y secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12p70 y TNF-α.

Estudios *in vivo* han indicado un rol jerárquico para los componentes del complemento en la remoción de los cuerpos apoptóticos C1q > C4, etc, la cual se correlaciona con la predisposición al desarrollo de LES.

Es de resaltar que el complemento es paradójico en la patogénesis del LES, la deficiencia de componentes de la vía clásica predispone a la enfermedad y sus componentes terminales bioactivos son nocivos. Debido a esta situación se han propuesto 3 pasos hipotéticos que podrían llevar al desencadenamiento de LES: el primer paso sería la falla para remover autoantígenos, ej. células apoptóticas, el segundo, la captación de estos autoantígenos por células dendríticas inmaduras en un ambiente proinflamatorio y tercero, sería la presentación de los autoantígenos a las células T.

Modelos experimentales han sugerido un papel de la vía alterna en la patogénesis de enfermedades reumatológicas. En artritis, esto se ha planteado al observar que la actividad del complemento en el líquido sinovial de los pacientes es menor que en los controles con un incremento en los fragmentos solubles de activación, así como en la producción local de proteínas del complemento. Los modelos experimentales de artritis indican que la inflamación de las articulaciones disminuye en animales deficientes de factor B (fB-/-) pero no en animales deficientes de factor C4 (C4-/-), indicando la participación de la vía alterna en la patogénesis de la enfermedad. En el caso de los modelos para lupus y encefalomielitis alérgica experimental, en los animales fB-/- disminuye la severidad de la enfermedad, igualmente la deficiencia del factor B y de C3 protege contra los efectos de los autoanticuerpos en el síndrome anti fosfolipídico.

Para finalizar, estos modelos experimentales también han indicado que fallas en la generación de ligandos apropiados para CR2 o su deficiencia *per se*, podrían verse involucrados en la generación de autoanticuerpos en el modelo experimental de lupus, quizá por la pérdida incompleta de la tolerancia en las células B.

Estos hallazgos sugieren que aunque los componentes y receptores del complemento parecen tener importancia en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes; por el momento el mecanismo no ha sido todavía establecido.

Apoptosis

La apoptosis o "muerte celular programada", es un proceso esencial para la formación y el mantenimiento de la homeostasis tisular, así como en la eliminación de células inmunes efectoras y en la resolución de procesos inflamatorios. Dos vías de señalización conducen a la activación de las caspasas (aspartate-specific cysteine proteases) enzimas responsables de la mediación del proceso de apoptosis. La vía extrínseca incluye la interacción de ciertos receptores pertenecientes a la familia del TNF (factor de necrosis tumoral), denominados receptores de la muerte, los cuales median el ensamblaje del complejo de señalización de inducción de la muerte DISC, (death inducing signaling complex), el cual conduce a la activación de las caspasas 8 y 3. La vía intrínseca es activada en respuesta a alteraciones a nivel del DNA y a la despolarización de la mitocondria con la subsiguiente liberación de citocromo c, el cual participa en la formación del apoptosoma en conjunto con el APAF-1 (apoptotic porteasas activating factor-1) y la procaspasa 9. Las células que sufren apoptosis se caracterizan por cambios bioquímicos y morfológicos como la redistribución de los lípidos de membrana y la fragmentación del núcleo y de los constituyentes celulares con la formación de vesículas rodeadas de membrana denominadas cuerpos apoptóticos. Los cambios en la membrana plasmática de las células apoptóticas facilitan su reconocimiento y remoción por fagocitos profesionales, como macrófagos y células dendríticas, o por células vecinas semiprofesionales como fibroblastos y células endoteliales. La eliminación de células apoptóticas es importante para prevenir el daño tisular y la inflamación ocasionado por la liberación del contenido tóxico intracelular.
(ver Capítulo 15).

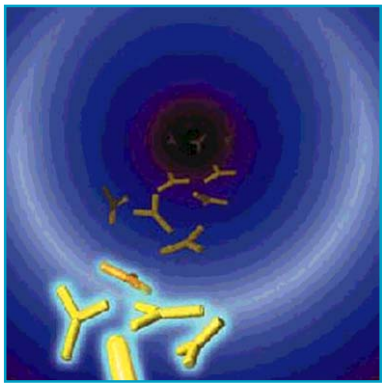
Lecturas recomendadas

- Iturry-Yamamoto GR, Portinho CP. Complement system actrivation, regulation and deficiencies. Rev Ass Med Brasil 2001; 47:41-51
- Walport MJ. Complement (First of two parts). N Engl J Med 2001; 344: 1058-1065
- Walport MJ. Complement (Second of two parts). N Engl J Med 2001; 344: 1058-1065
- Pittoni V, Valesini G. The clearence of apoptotic cells: implications for autoimmunity. Autoimmun Rev 2002; 1:154-161
- Boackle SA. Complement and autoimmunity. Biomed. Pharmacotherapy 2003; 57: 269-273
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z et al. Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci 2003; 116:4077-4085
- Kirschfink M, Mohines TE. Modern complement analysis. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10:982-989
- Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C et al. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. Trends in Immunol 2003; 24: 148-154
- Turnberg D, Botto M. The regulation of the complement system: Insights from genetically-engineered mice. Mol Immunol 2003; 40: 145-153
- Blom AM, Villoutreix BO, Dahlback B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? Mol Immunol 2004; 40:1333-1346
- Fujita T, Endo Y, Nonaka M. Primitive complement system-recognition and activation. Mol Immunol 2004; 41:103-111
- Holers MV, Thurman JM. The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. Mol Immunol 2004; 41:147-152
- Roos A, Xu W, Castellano G et al. A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. Eur. J. Immunol. 2004; 34:921-929.
- Sim RB, Tsiftsoglou SA. Proteases of the complement system. Biochem Soc Trans 2004; 32: 21-27
- Wen AL, Atkinson JP, Giclas PC. Clinical and laboratory evaluation of complement defciency. J. Allergy and Ciln Immunol 2004; 113: 585-593

5

RECEPTORES Fcγ Y AUTOINMUNIDAD

Luis Miguel Gómez
Carlos A. Cañas D.
Juan-Manuel Anaya



Los receptores Fc, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, participan en fenómenos inflamatorios como antiinflamatorios, influyendo sobre la inmunidad innata y adquirida. Factores ambientales y genéticos afectan su expresión. Los receptores Fc participan en el desarrollo de autoinmunidad y otras patologías como cáncer y enfermedades infecciosas. En autoinmunidad cumplen un papel protagónico, ya que controlan una serie de funciones inmunológicas que incluyen reacciones mediadas por complejos inmunes, liberación de citoquinas, lisis celular dependiente de complemento, apoptosis, degranulación de mastocitos, endocitosis y potenciación de la presentación antigénica clase I y clase II. La deficiencia de FcγRIIb está asociada con una susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes. Igualmente, el polimorfismo de los genes para estos receptores se asocia a varias enfermedades autoinmunes. En el presente capítulo se revisan las principales funciones de los receptores Fc, su polimorfismo genético y su implicación clínica, en particular en enfermedades autoinmunes.

Contenido

Estructura molecular
Funciones
Mecanismos de señalización celular
- Activación
- Inhibición
- Genética
- Ubicación genómica
- Susceptibilidad genética
- Implicaciones en autoinmunidad

Introducción

Los receptores Fc son una familia heterogénea de glicoproteínas de membrana que unen la fracción Fc de la Inmunoglobulina G (IgG) (1). Han sido clasificados en tres tipos básicos: FcγRI, FcγRII y FcγRIII (Tabla 1). EL FcγRI posee alta afinidad por la IgG en forma monomérica, mientras que FcγRII y FcγRIII son de baja afinidad y sólo unen la IgG en forma de complejos inmunes. Entre de las funciones efectoras importantes de estos receptores se pueden encontrar la fagocitosis y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Dichos receptores fueron descubiertos hace treinta y cinco años cuando se observó que las inmunoglobulinas IgG eran citofílicas para macrófagos en presencia de glóbulos rojos opsonizados, independiente de la región que se unía al péptido (región Fab) y dependiente de la región de la fracción cristalizable conocida como Fc (2).

Los receptores Fc poseen una función importante en el sistema inmune ya que proporcionan una de las conexiones entre la inmunidad humoral y la celular. La unión de estos receptores con su ligando, como la IgG, produce cambios conformacionales y por lo tanto activación de funciones efectoras como citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), ingesta de complejos inmunes, entre otras. Por otro lado, un subtipo de receptores Fc, que contienen una secuencia particular de aminoácidos en el dominio intracitoplasmático, modula la inhibición de la activación celular y es un mecanismo común para receptores que transmiten una señal negativa.

Las fisiopatologías de las enfermedades autoinmunes son el resultado de la pérdida de tolerancia con una exagerada activación de linfocitos autorreactivos, producción de autoanticuerpos y una inflamación constante en los sitios de depósito de complejos inmunes. Dado que en las enfermedades autoinmunes se observa una inhibición de la respuesta tanto humoral como celular, es fundamental determinar si los receptores Fc juegan un papel importante en estas patologías. En el presente artículo se revisan las principales funciones de los receptores Fc, su polimorfismo genético y la relación con patología autoinmune.

Estructura molecular

Los receptores Fc están compuestos por una cadena principal alfa (α) y unas cadenas accesorias como beta (β), gama (γ), xi (ξ), que influyen sobre la respuesta inmunológica, debido a los receptores de activación o de inhibición que posean, ya sea en su cadena α o en sus cadenas accesorias, mencionadas anteriormente (3). Los receptores Fc contienen tres dominios clasificados de acuerdo con su ubicación, llamados dominio extracitoplásmático, dominio transmembrana y dominio de activación/inhibición. El receptor de activación posee una región basada en tirosinas (ITAM) en su región citoplasmática que actúa como unidad central para la transmisión de señales, que redunda en funciones como ADCC, citotoxicidad dependiente de complemento (CDCC), endocitosis, regulación de anticuerpos, producción de citoquinas inflamatorias, potenciación de la presentación antigénica y regulación del estallido respiratorio (4,5). El receptor Fc inhibidor contiene un dominio de inhibición basado en tirosinas (ITIM) en su porción citoplasmática, que regula las funciones de los dominios activadores como es el caso de la regulación de anticuerpos y la activación de la apoptosis de las células B (6). Los receptores Fc son clasificados también por la afinidad del receptor por la IgG. Por lo tanto existen los receptores de alta afinidad y de baja afinidad (Tabla 1) (7).

Funciones

Éstas pueden clasificarse en tres: regulación de la respuesta inmune, ingesta de complejos inmunes y funciones del receptor neonatal para IgG (FcRn).

Dentro de la primera función se pueden destacar la proliferación de las células B, fagocitosis por macrófagos y degranulación de mastocitos. La internalización, después de la unión receptor-inmunoglobulina, da lugar a varias funciones efectoras como fagocitosis, histolisis, degranulación y activación de sitios blancos en regiones génicas de unión a factores de transcripción, las cuales inician cascadas de inflamación. Sin embargo, cuando se da la unión del receptor inhibidor FcγRIIb, se regulan de una manera negativa dichos receptores, expresándose ubicuamente en células del sistema inmune e inhibiendo funciones específicas como activación, proliferación de células B y degranulación de mastocitos. El sistema ITAM/ITIM se ha consolidado como un mecanismo del sistema inmunológico para regular sus actividades.

En la segunda función, la ingesta de complejos inmunes, los FcγRs pueden activar la internalización de antígenos capturados por anticuerpos, lo cual finaliza con la degradación del complejo antígeno-inmunoglobulina-com-

Tabla 1. Características generales de los receptores Fcγ.

Nombre	CD	Afinidad	Expresión celular	Motivo	PM (KDa)	Polimorfismo genético
FcγRI	64	Alta	Mo, DC, Eo,Ne	ITAM	72	Conservado
FcγRIIA	32	Baja	Mo, DC, Eo, Ne, Pl	ITAM	40	H131R
FcγRIIB	32	Baja	LB, mastocito, Bas, Mo, Eo, Ne, DC	ITIM	40	I232T
FcγRIIIA	16	Baja	Mo, NK, mastocito, Eo,DC	ITAM	50-80	F158V
FcγRIIIB	16	Baja	Ne, Eo	-	50-80	NA1-NA2

Mo: Monocito/macrófago; DC: célula dendrítica; Eo: eosinófilo; Ne: neutrófilo; Ba: basófilo; LB: linfocito B; NK: célula asesina natural, Ma: mastocito; Pl: plaquetas; PM: peso molecular; ITAM: motivo de activación basado en tirosinas; ITIM: motivo de inhibición basado en tirosinas; CD: cluster diferentiation; H: histidina; R: arginina; I: isoleucinaT: treonina; F: fenilalanina; V: valina; NA1: antígeno neutrofílico 1; NA2: antígeno neutrofílico 2.

plemento, definición de la ruta de procesamiento y presentación antigénica ya sea mediada por moléculas HLA clase I o clase II. Es importante recalcar que en enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES) existen fallas en la eliminación de los complejos inmunes (8). Hallazgos recientes han puntualizado sobre la eficiencia de la presentación antigénica si la ingesta de los complejos inmunes es mediada por receptores Fc (9).

La tercera función está relacionada con el receptor Fc neonatal (FcγRn). Este fue identificado primero en ratones como el receptor que transfería gamaglobulinas (IgGs) de la madre al hijo vía intestino neonatal (10). Sin embargo, se ha comprobado que el FcγRn es importante también para el mantenimiento de los niveles séricos de IgG (11). La expresión del FcRn en tejidos como hígado, glándula mamaria e intestino adulto podría hacer pensar en que estos receptores modulan el transporte de IgG a estos sitios. Esta hipótesis es reforzada por la afinidad del FcRn por la IgG y transportarse así por los tejidos (12).

Mecanismos de señalización celular

La activación o inhibición de receptores Fc depende de la presencia de ITAM o ITIM respectivamente, ya sea de una manera intrínseca en el receptor, como en el caso de FcγRIIa, o como parte de una cadena accesoria γ o ξ como el caso del FcγRIIIa y FcγRI. La excepción es el FcγRIIIb el cual no posee porción citoplasmática y, por lo tanto, no contiene dominios ITAM (13).

Activación

FcγRI y FcγRIII hacen parte de una familia de proteínas llamadas receptores inmunes reconocedores de cadenas múltiples (MIRR), los cuales se presentan en forma de complejos heterooligoméricos de una cadena alfa que une la inmunoglobulina y otra cadena de señalización. Los dominios citoplasmáticos de los MIRR son de tipo ITAM, es decir, de activación (14). Por lo tanto, cuando se une una IgG a FcγR se produce un cambio conformacional que conlleva a la activación de una familia de tirosin kinasas llamadas Src, como lo son Hck, Lyn y Fyr (15). Posteriormente, se produce el agrupamiento de moléculas con dominios SH2, como la kinasa Syk, que se unen a ITAM fosforilado, como una especie de anclaje molecular (Figura 1). Es importante señalar que dependiendo del tipo celular y la clase de receptor Fc usado, pueden estar involucradas diferentes clases de kinasas. Posteriormente, se procede la activación de la kinasa IP3, la cual desencadena la producción de PIP3 y a su vez la unión de moléculas con dominios PH como fosfolipasa C, subtipo γ (PLCγ) (16) y otra serie de kinasas como Tec dentro de las cuales se incluyen btk, itk y emt, que son expresadas en diferentes tipos de células mieloides (17). La PLCγ da lugar a dos componentes: diacilglicerol (DAG) y el 1,4,5-trifosfato (IP3). DAG permanece unido a membrana e IP3 promueve el paso continuo de calcio (18).

Inhibición

Las respuestas de inhibición en la señalización celular están dadas por los receptores que poseen dominios tipo ITIM, como el FcγRIIb. El receptor inhibidor FcγRIIb se une a IgG con baja afinidad e interactúa con complejos inmunes sólo a pH fisiológicos (19). La unión de complejos inmunes entre el receptor de la célula B (BCR) y FcγRIIb promueve la actividad inhibitoria que se lleva a cabo con el bloqueo en el flujo de calcio y por lo tanto reducción de la proliferación y diferenciación de células B, afectando la secreción de inmunoglobulinas (20).

ITIM se diferencia de ITAM en un residuo hidrofóbico

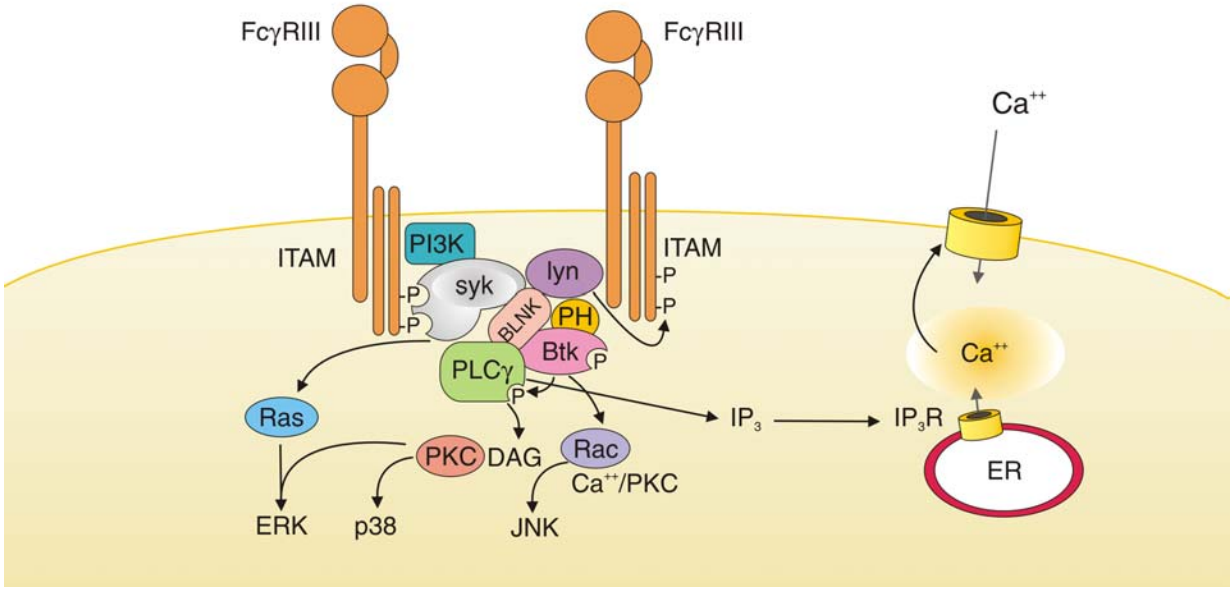


FIGURA 1.
Activación celular por FcγRIII.
Esta imagen ilustra las vías de señalización celular por fosforilación de ITAM.

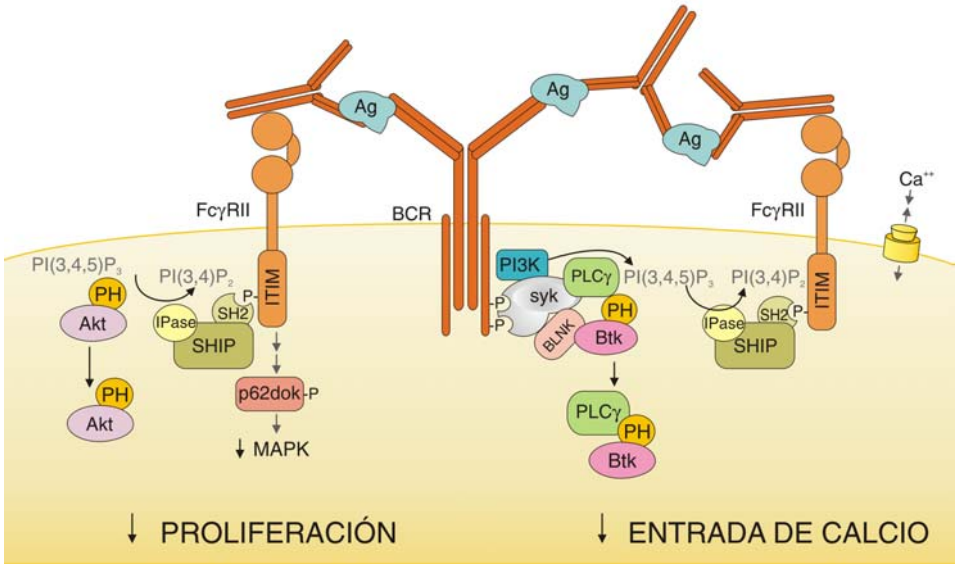


Figura 2.
Vías de señalización activadas por unión de BCR y FcγRIIB.
La activación celular es inhibida por la reunión de fosfatasas con inositol (SHIP) a los sitios fosforilados de los dominios ITIM.

pequeño en la posición –2 que generalmente se encuentra justo antes de la tirosina en el motivo ITIM dando lugar a inhibición más que activación (21).

La cascada de señalización se inicia con la unión del receptor Fc con la inmunoglobulina, generando un cambio conformacional que activa una kinasa de la familia SRC, llamada Lyn. Esta modificación desencadena el agrupamiento de fosfatasas que contiene dominios SH2 como SHP1, SHP2 y fosfatasas que contienen inositol llamadas SHIP (22). Esta modificación que se realiza en el dominio SH2, que es el sitio de unión para la fosfatasa SHIP, impide la activación de ITAM por hidrólisis de PIP3, que es una molécula que participa en la cascada de activación. En ausencia de PIP3, las proteínas de unión a dominios PH como Btk y PLCγ, son liberados de la membrana y la señal de entrada de calcio a la célula es bloqueada (23) (Figura 2).

Resumiendo, las consecuencias de la transmisión de señales después de la unión del receptor Fc con la inmunoglobulina son, en el caso de activación, la entrada de calcio a la célula y en el caso de la inhibición, el bloqueo de ésta. El calcio tiene una función importante en este tipo de respuesta, ya que funciones como la ADCC, CDCC, fagocitosis, liberación de citoquinas e inflamación, son dependientes de calcio, es decir, si no hay la suficiente concentración de calcio en la célula, dichos procesos no son posibles.

Genética

Los genes que codifican para los receptores de baja afinidad (FcγRIIA, B, C y FcγRIIIA y B) hacen parte del complejo de receptores Fc y están ubicados en la región 1q23. Su estudio ha sido difícil por la alta homología, fruto de duplicaciones y recombinaciones en esta región. En un sentido centrómero-telómero se ubican así: FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRIIC, FcγRIIIB, FcγRIIB, en una región de 10 Kb y con direcciones de inicio diferentes de la transcripción (Figura 3) (24). Esta es una región que ha sufrido rearreglos en sus genes, como es el caso de FcγRIIA y FcγRIIB, que dieron lugar, por entrecruzamiento desigual (entrecruzamiento entre cromosomas homólogos que no están perfectamente emparejados) a FcγRIIC (25). Además, es frecuente el "rearreglo alternativo" (formación de nuevos exones a partir de los preexistentes, cuando se da el proceso de transcripción de DNA) que producen diferentes formas solubles de la proteína (Figura 3).

El FcγRIIA, presente en mononucleares, neutrófilos y plaquetas, tiene dos alelos funcionalmente diferentes y ex-

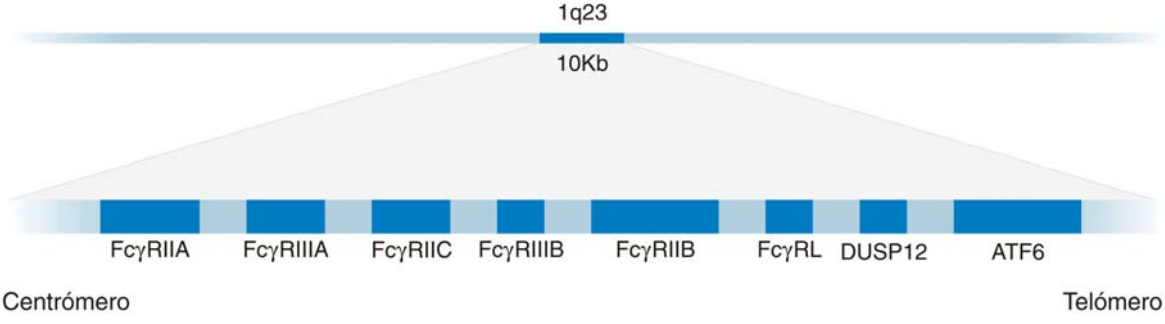


Figura 3.
Organización genómica de los receptores Fcγ.
Dicha región está ubicada en el brazo largo del cromosoma 1, en 1q23, y posee alrededor de 10 Kb. Esta zona se ha caracterizado por desarrollar entrecruzamientos desiguales y rearreglos alternativos, lo que ha dado lugar a duplicaciones y deleciones.

presados en forma codominante, que se generan del cambio de una guanina por una adenina, conocidos como H131 y R131, los cuales se diferencian en un aminoácido en la posición 131 del segundo dominio extracelular, el cual es sitio de unión para el fragmento Fc de la IgG (26). Este cambio genera diferentes afinidades por el tipo de inmunoglobulina, siendo especialmente la isoforma que contiene histidina la que se une más específicamente con IgG2, dando lugar a cambios funcionales importantes, ya que la IgG2 es un mal activador de la vía clásica del complemento (26,27).

FcγRIIb presenta un cambio de isoleucina por treonina en la región transmembrana de la proteína siendo de importancia funcional ya que es el único receptor de esta familia que tiene funciones de inhibición de la respuesta inflamatoria (28).

FcγRIIIa posee una sustitución de timina por una guanina, resultando en un cambio en el aminoácido valina por fenilalanina. Los pacientes que tienen el genotipo valina/valina, son considerados buenos respondedores para la unión de IgG1, IgG3 e IgG4 (29).

FcγRIIIb posee una sustitución de cuatro aminoácidos denominada el antígeno neutrofílico (NA), que corresponde al dominio distal en la porción extracitoplasmática del receptor. Esta porción es un sitio importante que afecta la glicosilación de la proteína (30). Así, las variantes alélicas son denominadas NA1 en el caso de ser el genotipo sin la sustitución y NA2 para la sustitución. La fagocitosis de complejos inmunes inducida por el alelo NA1 es más eficiente que por el alelo NA2 (Tabla 1) (31).

Fc y autoinmunidad

Las enfermedades autoinmunes, desde el punto de vista etiológico, conjugan factores medioambientales, genéticos, inmunológicos y hormonales. Éstas se caracterizan por la presencia de una respuesta linfocitaria T y/o B autorreactiva en ausencia de alguna causa discernible (infección o cáncer), acompañados de inflamación, producción de autoanticuerpos, presencia de autoantígenos (modificados o no), pérdida de la tolerancia y daño tisular. Desde el punto de vista inmunogenético, las enfermedades autoinmunes son complejas, debido a que no siguen un patrón de herencia mendeliano y son poligénicas, sumado a interacciones génicas como epístasis y desequilibrio de ligamiento (32). El estudio de los receptores Fc en el contexto de autoinmunidad ha despertado un gran interés por su implicación biológica en la depuración de complejos inmunes, entre otras. Dentro del componente genético, estudios en ratones que son deficientes para FcγRs, han mostrado una incapacidad para fagocitar complejos inmunes de una manera eficiente (33). Además, estos ratones sufren espontáneamente varias enfermedades autoinmunes (34).

Los polimorfismos de los receptores Fc, influyen en la eficacia de la respuesta celular y han sido asociados con enfermedades inflamatorias, infecciosas y autoinmunes, así como con la severidad de éstas. Además, estudios recientes han demostrado que estos polimorfismos también pueden afectar la respuesta a diversos medicamentos biológicos como los anticuerpos monoclonales (35). Desequilibrios entre el balance de receptores Fc inhibidores o activadores puede ocasionar una ruptura de la tolerancia y desencadenar enfermedad autoinmune (Figura 4).

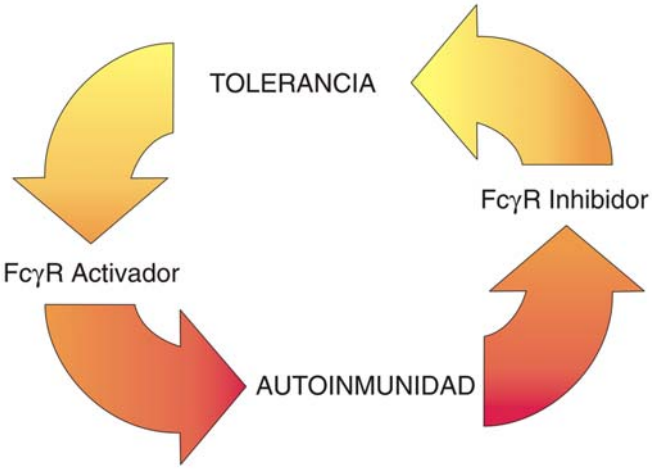


Figura 4.
Participación de los receptores Fc en el equilibrio entre tolerancia y autoinmunidad.
El desequilibrio entre receptores Fc activadores e inhibidores puede llevar a una ruptura de la tolerancia inmunológica y así desencadenar la producción de autoanticuerpos, la depuración frustrada de complejos inmunes y, en consecuencia, el desarrollo de enfermedad autoinmune.

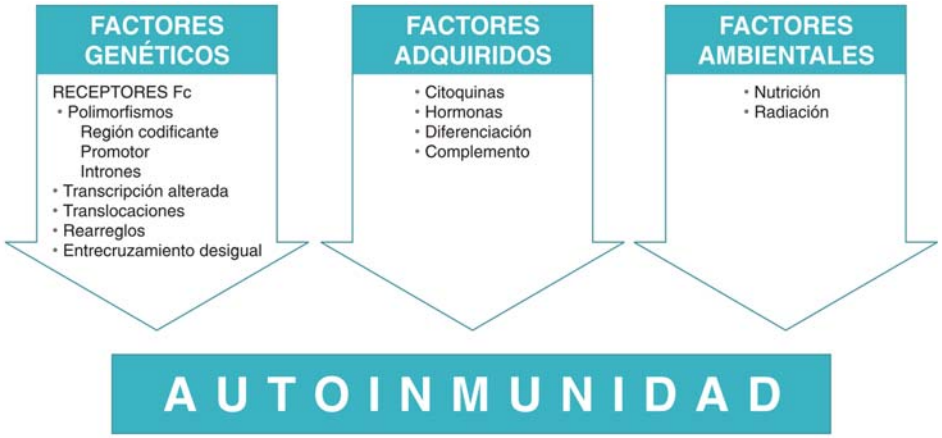


Figura 5.
Representación esquemática de factores genéticos, adquiridos y ambientales, involucrados en la regulación de la expresión y función de los receptores Fc.

Tabla 2. Polimorfismos de genes de receptores Fcγ en enfermedades autoinmunes.

Enfermedad	Polimorfismo	Tipo de estudio	Población	Comentario	Ref
AR	FcγRIIIA-158V	Casos y controles	Caucásicos (UK-India del norte-Pakistán)	Asociación	38
	FcγRIIIA-158P/P	Casos y controles	Europea (España)	Asociación	39
	FcγRIIA, B, IIIA, B	Casos y controles	Asiática (Japón)	Asociación débil con IIIA158F/V y ER positivo	47
	FcγRIIIA-158V/V	Casos y controles	India (norte) y Europa (UK)	Protección débil	48
	FcγRIIA-131R/R	Casos y controles	Caucásicos (Polonia)	No asociación	49
	FcγRIIA, IIIA, B	Casos y controles	Caucásicos (Noruega)	No asociación	50
	FcγRIIA, IIIA, B	Ligamiento	Caucásicos (Francia)	Asociación fuerte para alelos con alta afinidad y con ER +	51
LES	FcγRIIB	Casos y controles	Caucásicos (Suecia)	No asociación	52
	FcγRIIA, IIIA	Casos y controles	Asiática (Korea)	Asociación independiente del HLA con el genotipo FcγRIIA-131R/R	53
	FcγRIIA-131R	Ligamiento	Caucásicos (USA)	Asociación	54
	FcγRIIB-232T/T FcγRIIIB-NA2/NA2	Casos y controles	Asiática (Tailandia)	Asociación significativa con los dos genotipos	55
	FcγRIIA-131R	Casos y controles	Asiática (Vietnam)	Asociación	56
	FcγRIIIB-NA1/NA2	Casos y controles	Caucásicos (España)	Asociación débil	57
	FcγRIIA-131R/R	Casos y controles	Caucásicos (Alemania)	Asociación con severidad de la enfermedad	58
	FcγRIIIA-158F	Ligamiento y casos y controles	Caucásicos (Inglaterra, USA, Grecia, Alemania, Holanda, Francia, Italia), Hispana (México), Afro-americana, Asiáticos, (China, Japón, Korea, Malasia), Africanos (Haití)	Metaanálisis con 3.114 pacientes encuentran asociación con NL (este trabajo analiza 17 estudios de polimorfismos en LES con y sin NL y alrededor de 2580 controles)	36
	FcγRIIA	Casos y controles	Hispana (Chile)	No asociación	59
GW	FcγRIIA- 131R/R, IIIA-158F/F	Casos y controles	Caucásicos (Holanda)	Este haplotipo es un factor de riesgo para recaídas de la enfermedad	37
MG	FcγRIIA-131R/R	Casos y controles	Caucásicos (Holanda)	Asociación	40
	FcγRIIIB-NA1/NA1	Casos y controles	Caucásicos (Noruega)	Asociación con la severidad	41
PTI	FcγRIIIB-NA1/NA1	Casos y controles	Caucásicos (Irlanda)	Asociación los genotipos	42
	FcγRIIIA-158V/F				
	FcγRIIIA-158F/F	Casos y controles	Asiáticos (Japón)	Asociación débil	43
	FcγRIIA-131H FcγRIIIA-158V	Casos y controles	Caucásicos (Canadá)	Asociación de los genotipos con forma aguda en niños	60
EM	FcγRIIA, IIIA	Casos y controles	Caucásicos (Noruega)	No asociación	44
	FcγRIIA, IIIA, B	Casos y controles	Caucásicos (Holanda)	No asociación	46
GB	FcγRIIA, IIIA, B	Casos y controles	Caucásicos (Noruega)	No asociación	46
	FcγRIIIB-NA2	Casos y controles	Caucásicos (Holanda)	Asociación con severidad de la enfermedad	45
	FcγRIIA, IIIA, B	Casos y controles	Caucásicos (Noruega)	No asociación	61

Enf: enfermedad; Ref: referencia; AR: artritis reumatoidea; LES: lupus eritematoso sistémico; GW: granulomatosis de wegener; MG: miastenia gravis; PTI: púrpura trombocitopénica idiopática; EM: esclerosis múltiple; GB: Guillain Barre; FR: factor reumatoideo, ER: epítope reumatoideo; NL: nefritis lúpica; UK: reino unido. La identificación de los datos fue realizada mediante búsqueda en Medline (julio de 2004), basada en palabras claves como "systemic lupus erythematosus" (o la enfermedad correspondiente), "Fc receptor", "polymorphism", "genetic". Sólo se consultaron artículos del idioma ingles o español.

Un resumen de los principales estudios de polimorfismos genéticos de los receptores Fcγ en enfermedades autoinmunes es dado en la Tabla 2. Algunos polimorfismos en las regiones reguladoras se han asociado con enfermedad. Finalmente, el uso de agentes terapéuticos que modulan la expresión de dichos receptores pueden ser útiles en la práctica clínica (Tabla 3). Una regulación exagerada en el receptor inhibidor podría evitar reacciones de defensa tan importantes como la ADCC, fagocitosis y liberación de citoquinas (Figura 5).

Tabla 3. Aplicación clínica del conocimiento básico de la interacción IgG-FcR.

Utilidad	Mecanismo de acción / patología
Amplificación selectiva de ITIM	La vía de señalización ITIM específica de FcγRIIb, siendo un importante regulador negativo de la respuesta inflamatoria y además su expresión es constante a través de todas las células del sistema inmunológico.
Bloqueo unión IgG-FcR	El sitio de unión entre Fc e Ig está localizado en el segundo dominio de FcγR. Por lo tanto actualmente se están construyendo anticuerpos que bloquean dicha unión para tratamientos en asma y algunas enfermedades autoinmunes (62).
Terapia basada en ITIM	En modelos murinos de púrpura trombocitopénica autoinmune, la administración de la porción Fc, y de Ig intravenosa en dichos ratones, evitó la fagocitosis de plaquetas. Dicho mecanismo es explicado por el aumento de la expresión de FcγRIIb, sobre macrófagos del bazo (63).
Anticuerpos anti-IgE	Este anticuerpo se une directamente contra el FcεRI. Es usado para el tratamiento de rinitis alérgica y asma bronquial. Este anticuerpo posee una reacción cruzada con el FcγRIIb (64).
Marcadores de diagnóstico tumorales	El FcγRIIb1 está involucrado en el desarrollo de tumores, actuando como factor de progresión cuando se expresa ectópicamente en células tumorales no linfoides. Además, la expresión de FcγRIII soluble se encuentra drásticamente disminuida en pacientes con mieloma múltiple. La exposición prolongada de este receptor soluble induce la lisis de células tumorales del mieloma, constituyéndose en una herramienta terapéutica importante (65).
Modulación de la expresión en Fc	La vinblastina y el danazol reducen la expresión de receptores Fc en niños con púrpura trombocitopénica autoinmune, con una remisión completa del 30% de los pacientes (66).
Marcadores en glomerulonefritis	En modelos de glomerulonefritis en ratas se ha demostrado que en macrófagos glomerulares existe fagocitosis aumentada mediada por Fc, que se va disminuyendo paulatinamente en etapas crónicas de la enfermedad. Esto podría ser un criterio de progresión de la enfermedad (67).
Terapia con receptores funcionales	Algunos estudios en lupus eritematoso sistémico revelan que los receptores Fc no son funcionales e incluso dicho efecto también se explica por la exagerada homocigosis para el FcγRIIa H131 (68).
Inhibición de los Fc	Pacientes con psoriasis, que son tratados con ciclosporina o acitretina, disminuyen la expresión de Fc. Además, algunos tratamientos para la artritis reumatoidea disminuyen la expresión de FcγRIIa (69).

Referencias

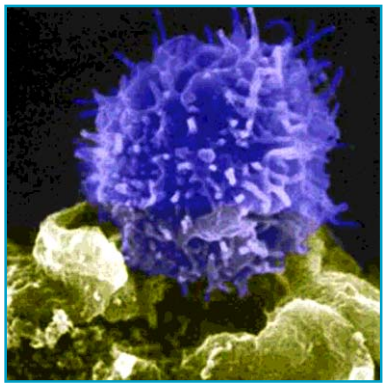
1. Fridman WH, Bonnerot C, DaeÈron M, et al. Structural bases of Fcg receptor functions. Immunol Rev 1992; 125: 49-76
2. Berken A and Benacerraf B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. J Exp Med 1966; 3:119-144
3. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol 2001; 19: 275-290
4. Heyman B. Feedback regulation by IgG antibodies. Immunol Lett 2003; 88:157-161
5. Van den Herik-Oudijk IE, Capel PJ, Van der Bruggen T, et al. Identification of signalling motifs within human FcgRIIa and FcgRIIb isoforms. Blood 1995; 85:2202-2211
6. Pearse RN, Kawabe T, Balland S, et al. SHIP recruitment attenuates FcgRIIb-induced B-cell apoptosis. Immunity 1999; 10:753-760
7. Dijstelbloem H, Van de Winkel J and Kallenberg. Inflammation in autoimmunity receptors for IgG revisited. Trends Immunol 2001; 22: 510-516
8. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. Nat Rev Immunol 2002; 2:580-592
9. Amigorena S, Bonnerot C. Fc receptor signalling and trafficking: a connection for antigen processing. Immunol Rev 1999; 172:279-284
10. Wallace KH, Rees AR. Studies on the immunoglobulin-G Fc-fragment receptor from neonatal rat small intestine. Biochem J 1980; 188:9-16
11. Christianson GJ, Brooks W, Vekasi S, et al. Beta 2-microglobulin-deficient mice are protected from hypergammaglobulinemia and have defective antibody responses because of increased IgG catabolism. J Immunol 1997; 159:4781–4792
12. Ghetie V and Sally Ward E. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. Ann Rev Immunol 2000; 18:739-766
13. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. Ann Rev Immunol 1991; 9:457-492
14. Luanfeng P, Peng P. Signalling transduction by IgG receptors. Chinese Medical Journal 2003; 116:487-494
15. Durden DL, Kim HM, Calore B, et al. The Fc gamma RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. J Immunol 1995; 154: 4039-4047
16. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, et al. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. Cell 1995; 83:1037-1046
17. Kawakami Y, Yao L, Han W, et al. Tec family protein-tyrosine kinases and pleckstrin homology domains in mast cells. Immunol Lett 1996; 54:113-117
18. Wang D, Feng J, Wen R, et al. Phospholipase C gamma 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. Immunity 2000; 13:25–35
19. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. Adv Immunol 1994; 57:1-27
20. Diegel ML, Rankin BM, Bolen JB, et al. Crosslinking of Fcg receptor to surface immunoglobulin on B cells provides an inhibitory signal that closes the plasma membrane calcium channel. J Biol Chem 1994; 269:11409-11416
21. Muta T, Kurosaki T, Misulokin Z, et al. A 13-amino acid motif in the cytoplasmic domain of FcgRIIB modulates B cell receptor signalling. Nature 1994; 368:70-73
22. Ono M, Bolland S, Tempst P, et al. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor FcγRIIB. Nature 1996; 383:263-266
23. Bolland S, Pearse RN, Kurosaki T, et al. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. Immunity 1998; 8:509-516
24. Su K, Wu J, Edberg JC, et al. Genomic organization of classical human low-affinity Fcγ receptors genes. Genes Immun 2002 3(suppl 1) S51-S56
25. Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, et al. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. J Biol Chem 1993; 268: 7346-7349
26. Warmerdam PA, Van de Winkel JG, Vlug A, et al. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. J Immunol 1991; 147: 1338-1343
27. Clark M, Stuart S, Kimberly RP. A single aminoacid distinguishes the high-responder from the low-responder form of Fc receptor II on human monocytes. Eur J Immunol 1991; 21: 1911-1916

28. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, et al. Fcg receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. Arthritis Rheum 2002; 46: 1242–1254
29. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. J Clin Invest 1997; 100: 1059-1070
30. Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, et al. Biallelic neutrophil NA-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). Blood 1990; 75: 213-217
31. Salmon JE, Millard SS, Brogle NL, et al. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant dependent and allele-sensitive manner. J Clin Invest 1995; 95: 2877-2885
32. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunol Today 1993; 14: 426-430
33. Takai T, Li M, Sylvestre D, et al. FcR ã-chain deletion results in pleiotrophic effector-cell defects. Cell 1994; 7 6: 519–529
34. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in FcgRIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. Immunity 2000; 13, 277–285
35. Van der Pol WL, van de Winkel JG. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. Immunogenetics 1998; 48: 222–32
36. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP. Role of the Fcgamma receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. Arthritis Rheum 2002; 46: 1563–1571
37. Dijstelbloem HM, Scheepers RH, Oost WW, et al. Fc gamma receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. Arthritis Rheum 1999; 42: 1823–1827
38. Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, et al. Fcgamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. Arthritis Rheum 2000; 43:2328–2334
39. Nieto A, Caliz R, Pascual M, et al. Involvement of Fcgamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43: 735–739
40. Van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. Tissue Antigens 2003; 61:189-202
41. Van der pol WL, Jansen MD, Kuks TB, et al. Association of the Fc gamma receptor IIA-R/R131 genotype with myasthenia gravis in Dutch patients. J Neuroimmunol 2003; 144: 143-147
42. Williams Y, Lynch S, McCann S, et al. Correlation of platelet Fc gammaRIIA polymorphism in refractory idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1998; 101: 779-782
43. Fujimoto TT, Inoue M, Shimomura T, et al. Involvement of Fc gamma receptor polymorphism in the therapeutic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2001; 115: 125-130
44. Myhr KM, Raknes G, Nyland H, et al. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcgammaR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. Neurology 1999; 52: 1771-1776
45. Van der Pol WL, van den Berg LH, Scheepers RH, et al. IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome. Neurology 2000. 54:1661-1665
46. Breij EC, van der Pol WL, van Winsen L, et al. No association of Fc gamma RIIa, Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIIb polymorphisms with MS. J Neuroimmunol 2003; 140: 210-215
47. Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, et al. Studies on the association of Fc gamma receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. Genes Immun 2002; 3:488-493
48. Milicic A, Misra R, Agrawal S, et al. The F158V polymorphism in Fc gammaRIIIA shows disparate associations with rheumatoid arthritis in two genetically distinct populations. Ann Rheum Dis 2003; 62: 1021-1023
49. Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, et al. Fc gamma RIIa polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 2002; 20: 841-844
50. Brun JG, Madland TM, Vedeler CA. Immunoglobulin G Fc-receptor (FcgammaR) IIA, IIIA, and IIIB polymorphisms related to disease severity in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2002; 29:1135-1140
51. Radstake TR, Petit E, Pierlot C, et al. Role of Fcgamma receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2003; 30: 926-933
52. Magnusson V, Zunec R, Odeberg J, et al. Polymorphisms of the Fc gamma receptor type IIB gene are not associated with systemic lupus erythematosus in the Swedish population. Arthritis Rheum 2004; 50:1348-1350
53. Lee HS, Chung YH, Kim TG, et al. Independent association of HLA-DR and Fc gamma receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology 2003; 12:1501-1507
54. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, et al. Association of Fcγ receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a family-based association study in Caucasians. Arthritis Rheum 2004; 50: 671-673
55. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. Tissue Antigens 2003; 61: 374-383
56. Khoa PD, Sugiyama T, Yokochi T. Fc gamma receptor II polymorphisms in Vietnamese patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2003; 12:704-706
57. Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. FcγRIIA, FcγRIIIA and FcγRIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. Eur J Immunogenet 2002; 29: 301-306
58. Manger K, Repp R, Jansen M, et al. Fcg receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. Ann Rheum Dis 2002; 61: 786-792
59. Carrion F, Figueroa F, Martinez ME, et al. Polymorphisms of FcγIIa receptors in Chilean patients with systemic lupus erythematosus. Rev Med Chile 2003; 131: 11-18
60. Carcao MD, Blanchette VS, Wakefield CD, et al. Fcgamma receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2003; 120: 135-141
61. Vedeler CA, Myhr KM, Nyland H. Fc receptors for immunoglobulin G: a role in the pathogenesis of Guillain-Barre syndrome and multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2001; 118:187-193
62. Rigby LJ, Epa VC, Mackay GA, et al. Domain one of the high affinity IgE receptor, Fc epsilon RI, regulates binding IgE through its interface with domain two. J Biol Chem 2000; 275: 9664-9672
63. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. Science 2001; 291: 484-486
64. Kinet JP. Atopic allergy and other hypersensitivities. Curr Opin Immunol 1999; 11: 603-605
65. Zusman T, Gohar O, Eliassi Y, et al. The murine Fc-gamma (Fc gamma) receptor type II B1 is a tumorigenicity-enhancing factor in polyoma-virus-transformed 3T3 cells. Int J Cancer 1996; 65: 221-229
66. Choudhry VP, Kashyap R, Ahlawat S, et al. Vinblastine and danazol therapy in steroid resistant childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Int J Hematol 1995; 61: 157-162
67. Moxey-Mims MM, Noble B. Glomerular macrophage phagocytic activity in experimental immune complex nephritis. Kidney 1994; 45: 1326-32
68. Kastner P, Franke H, Kleinert P, et al. Fc receptor mediated immune complex clearance function of the mononuclear phagocyte system in systemic lupus erythematosus. Allerg Immunol 1990; 2:103-110
69. Bjerke JR, Tigalonova M, Jensen TS, Matre R. Fc gamma-receptors in skin and serum from patients with psoriasis, before and after therapy. Acta Derm Venereol 1994; 186: 141-142

6

RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA

Paula A. Correa



El sistema inmune posee múltiples mecanismos de respuesta, encargados de regular y orquestar los diferentes procesos en los cuales se busca eliminar un antígeno. Es así como la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida, logran conjugar los esfuerzos para regular el sistema inmunológico. La inmunidad adquirida está subdividida en varias fases estrictamente reguladas para dar una respuesta inmune específica y selectiva, que parte del reconocimiento específico de patógenos o moléculas antigénicas, capaces de activar tanto los linfocitos B como los linfocitos T, para generar los procesos de respuesta inmune humoral y celular, a través de las células T y/o B efectoras, al mismo tiempo que tiene la capacidad de expandir la clona de dichas células capaces de responder a un antígeno específico y conservar memoria frente a él, en una segunda respuesta.

Contenido

Clases
Características
Componentes celulares
Fases
Mecanismos efectores
Inmunidad adquirida y autoinmunidad

Introducción

La respuesta inmune innata y la inmunidad adquirida no operan por separado, al contrario, son vías complementarias a través de las que se genera una respuesta inmunológica más efectiva. En la mayoría de los casos las reacciones producidas por la inmunidad innata conllevan a una activación de la inmunidad específica o adquirida, para asegurar la eliminación del agente agresor, de tal forma que la respuesta inmune adquirida, busca activar y producir factores que estimulen e incrementen la respuesta inmune innata y aseguren una mejor respuesta inmunológica frente a futuros encuentros con el mismo microorganismo o antígeno.

La inmunidad adquirida, adaptativa o también llamada específica, es capaz de reconocer y eliminar específicamente microorganismos o moléculas extrañas (antígenos externos). Contrario a la inmunidad innata, la respuesta inmune adaptativa responde de forma selectiva bajo varias características tales como la especificidad del antígeno, la diversidad y la capacidad de generar memoria inmunológica (Tabla 1). La especificidad antigénica del sistema inmune adaptativo permite distinguir diferencias muy sutiles entre los antígenos, tanto los linfocitos y sus receptores como los anticuerpos pueden distinguir entre dos moléculas que difieren en un solo aminoácido. Además, el sistema inmune puede generar una gran diversidad en su capacidad de reconocimiento molecular permitiendo identificar billones de antígenos diferentes molecularmente. Una vez el sistema inmune ha reconocido y respondido a un antígeno, éste adquiere la capacidad de generar la memoria inmunológica, la cual pretende asegurar que ante un segundo encuentro con el mismo antígeno se induzca una reactivación inmunológica más rápida y efectiva. Gracias a estas características el sistema inmune puede conferir una larga vida inmunológica frente a muchos agentes infecciosos. Finalmente, la respuesta inmune adquirida, al igual que la innata, tiene la capacidad bajo condiciones normales de discriminar entre lo propio y lo no propio y responder sólo ante moléculas extrañas, lo cual es esencial para la homeostasis inmunológica y el bienestar del organismo en general, ya que una alteración en esta capacidad puede generar procesos patológicos tales como la autoinmunidad e, incluso pueden llegar a ser fatales.

Clases de respuesta inmune adquirida

Básicamente hay dos tipos de respuesta inmune adaptativa, una de ellas es la inmunidad humoral y la otra es la inmunidad mediada por células. Estos dos tipos de respuesta comprometen un sinnúmero de componentes del sistema inmune cuya finalidad es la de eliminar diferentes tipos de antígenos.

La inmunidad humoral, está mediada por moléculas solubles vertidas a la sangre y las secreciones mucosas, conocidas como anticuerpos, los cuales son producidos por los linfocitos B activados. Los anticuerpos reconocen antígenos microbianos, los identifican de manera específica, y los neutralizan, contrarrestando así la infectividad de los microorganismos. Igualmente, los anticuerpos tienen la función de marcar la superficie celular de los microorganismos para que luego sean eliminados por diferentes mecanismos efectores que posee el sistema inmune. La inmunidad humoral se constituye como el principal mecanismo de defensa contra microorganismos extracelulares y las toxinas que estos puedan producir. Los anticuerpos en sí mismos son un mecanismo de respuesta especializado, y subdividido en diferentes tipos, que pueden activar diferentes mecanismos de respuesta inmunológica, tales como inducción celular, promoción de la fagocitosis y estimulación de síntesis de mediadores de inflamación como son las citoquinas proinflamatorias. La respuesta inmune humoral entonces, involucra la interacción de las células B con el antígeno y su subsiguiente proliferación y diferenciación a células plasmáticas encargadas de secretar los anticuerpos específicos (Figura 1a).

La inmunidad mediada por células, también llamada inmunidad celular, está dada por los linfocitos T. Los microorganismos y moléculas intracelulares tales como virus, algunas bacterias y restos celulares pueden proliferar y mantenerse al interior de las células, especialmente dentro de macrófagos y fagocitos en general, quedando inaccesibles a la acción de los anticuerpos circulantes y es so-

Tabla 1. Características de la respuesta inmune adquirida vs. la innata.

Característica	Inmunidad innata	Inmunidad adquirida
Especificidad	Para estructuras compartidas entre grupos de microorganismos	Para antígenos, microorganismos y antígenos no microbianos
Diversidad	Limitada, generada por la línea germinal	Muy amplia, los receptores son generados por recombinación somática de segmentos génicos
Memoria	Ninguna	Si
Reactividad a lo propio	No	No
Componentes	**Inmunidad innata**	**Inmunidad adquirida**
Barreras físicas y químicas	Piel, mucosas, epitelio, químicos antimicrobianos	Linfocitos epiteliales, secreción de anticuerpos
Proteínas sanguíneas	Complemento	Anticuerpos
Células	Fagocitos, células NK	Linfocitos

* Características inmunológicas bajo parámetros de respuesta inmune normal, tanto innata como adquirida.

bre este tipo de antígenos, que la inmunidad celular ejerce su función, la cual promueve la destrucción de las células infectadas con microorganismos, para eliminar los reservorios de la infección. Los linfocitos T ayudadores (LT CD4+) y los citotóxicos (LT CD8+) son las células efectoras en la respuesta inmune celular (Figura 1b), ambos tipos de linfocitos pueden inducir la síntesis de citoquinas, principalmente los LT CD4+, las cuales, a su vez, inducen varios mecanismos efectores de respuesta inmunológica asociados con inmunidad celular.

Hasta hace poco se discutía la existencia de un tercer grupo de células, pertenecientes a los linfocitos T CD4+, que actúan de manera independiente y cuya función primordial era la supresión de la respuesta inmune. Actualmente se plantea que la respuesta celular y humoral, comparte un mecanismo de regulación por parte de los LT ayudadores, encargados de suprimir los factores celulares y humorales activados durante la respuesta inmune adquirida, una vez ellos hayan cumplido su función. Estos linfocitos se conocen como células T reguladoras (Treg) y se caracterizan por el fenotipo CD4+CD25+, además expresan IL-10 y TGF-β, importantes en el control de la respuesta inmune inflamatoria de tipo Th1, pero también Th2. Este tipo de células actúan principalmente en intestino y tejido mucoso. Las Treg se consideran de gran importancia en la prevención de alteraciones en la respuesta inmune, ya que tienen el papel de evitar la polarización de las respuestas Th1 y Th2, para mantener el balance del sistema inmune y evitar la generación de procesos patológicos tales como la autoinmunidad. Igualmente, se les ha identificado la función de eliminar LT autorreactivos, complementando la función de la tolerancia central e induciendo la tolerancia periférica. Algunos autores clasifican las Treg en varios subgrupos, denominados Treg, Tr1 y Th3, cada uno de ellos con funciones diferentes aunque complementarias y con características específicas.

Características de la respuesta inmune adquirida

La respuesta inmune adquirida, tanto humoral como celular posee unas características esenciales, propias tanto de los antígenos como de los linfocitos T y B que median este tipo de respuesta. Estas características son:

Especificidad y diversidad

La respuesta inmune es específica para los diferentes antígenos y para las diferentes porciones que conforman una proteína, polisacárido u otras macromoléculas. Las porciones que son reconocidas específicamente por linfocitos se conocen como determinantes antigénicos o epítopes y se encargan de definir la especificidad de los receptores de linfocitos expresados en la membrana de la

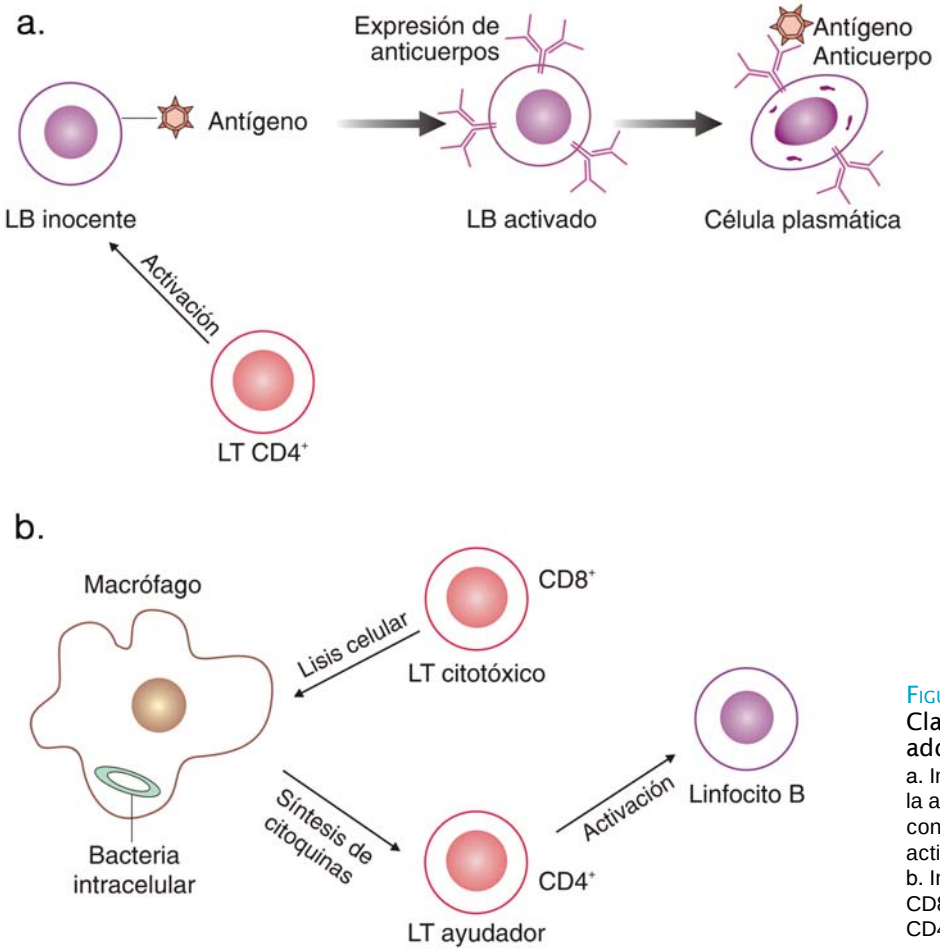


FIGURA 1.
Clases de inmunidad adquirida.
a. Inmunidad humoral, mediada por la activación de LB, bien sea por contacto con el antígeno o por activación dependiente de LT CD4+. b. Inmunidad celular mediada por LT CD8+ con actividad citotóxica y CD4+ o ayudadores.

superficie celular. Estos determinantes antigénicos serán los encargados de seleccionar las clonas de linfocitos que darán respuesta a un antígeno determinado en los individuos sensibilizados. Este concepto es el aspecto básico de la hipótesis de selección clonal, que hace parte de la respuesta inmune adquirida, como se tratará más adelante.

El número total de especificidades antigénicas de los linfocitos presentes en un individuo se conoce como repertorio linfocítico y será el encargado de controlar la respuesta inmune específica, durante el ciclo de vida de dicho individuo, se estima que el sistema inmune de un individuo tiene la capacidad de discriminar entre 10^7 y 10^9 determinantes antigénicos diferentes tanto para LB como LT, que se conoce como diversidad inmunológica, la cual depende de la variabilidad genética para los TCR y BCR, bien sea por recombinación o combinación de secuencias de nucleótidos.

Memoria inmunológica

La exposición del sistema inmune a un antígeno extraño genera capacidad de respuesta contra éste, si se genera una segunda exposición frente al mismo antígeno, se producirá una respuesta inmune secundaria, generada por las clonas de linfocitos que ya habían reconocido el antígeno previamente. Usualmente, esta respuesta es más rápida, mayor y cualitativamente diferente de la primera respuesta. La memoria inmunológica generalmente es parcial, ya que frente a cada nuevo encuentro se expandirá la misma clona de linfocitos específicos para ese antígeno, además se genera en cada encuentro la activación de nuevos linfocitos vírgenes, los cuales tienen la característica de poseer una vida media mayor al resto de linfocitos generados por expansión clonal, en respuesta al mismo antígeno. Los linfocitos implicados en la respuesta secundaria se conocen como células de memoria, caracterizadas por ser más eficientes en la eliminación del antígeno. Las células de memoria son tanto del tipo B como T, y una característica importante de los LB de memoria es que sintetizan anticuerpos en mayor cantidad y los unen al antígeno con mayor afinidad. Por su parte, a los LT de memoria se les ha encontrado que son más eficientes en la ubicación de sitios de infección que los LT vírgenes.

Autolimitación

Toda respuesta inmune normal deberá ir disminuyendo en razón del tiempo y la eliminación del antígeno, a partir del momento en el que se genera la estimulación antigénica, así se asegura que el sistema inmune restaurará sus niveles basales y se logrará adquirir de nuevo la homeostasis, luego de eliminado el estímulo inicial, asegurando que el antígeno y los mecanismos reguladores de la respuesta inmune no generarán una respuesta anormal contra lo propio.

Discriminación entre propio y no propio

Esta característica permite establecer las propiedades de un sistema inmune normal, ya que busca reconocer, responder y eliminar antígenos no propios, mientras que es capaz de tolerar y no reaccionar adversamente contra las moléculas o sustancias potencialmente antigénicas, propias. La discriminación entre propio y no propio es el fenómeno de *tolerancia inmunológica* (Caja1), que se da a nivel central y periférico y es preparada y mantenida por algunos mecanismos (Figura 2), incluyendo selección de linfocitos T por respuesta a presentación antigénica, eliminación de linfocitos autorreactivos, inactivación funcional y bloqueo de la estimulación. La pérdida o anormalidad del proceso de tolerancia genera una respuesta inmune contra lo propio (autoantígenos), lo cual generalmente conlleva a un proceso patológico denominado *autoinmunidad*.

Componentes celulares del sistema inmune adquirido

La respuesta inmune adquirida involucra la mayoría de células que hacen parte del sistema inmunológico, sin em-

Caja 1. Tolerancia

La tolerancia es el proceso que elimina o neutraliza los linfocitos autorreactivos, que pueden llegar a generar la autoinmunidad. Los procesos de control de la tolerancia pueden ser ejercidos sobre los LT y LB. El mecanismo identificado hasta el momento para la eliminación de células B autorreactivas, encargadas de sintetizar autoanticuerpos, corresponde a una deleción clonal de células B inmaduras, a nivel de la médula ósea, en la zona de células T del bazo y en los nódulos linfáticos. El control en estas células también puede generarse por inactivación funcional del linfocito (anergía) y reedición del BCR, mecanismo por el cual se cambia la especificidad de este receptor al encuentro con un autoantígeno.

Los mecanismos de control para el LT son un poco más estrictos y se generan a dos niveles: la tolerancia central que corresponde en la deleción de LT autorreactivos a nivel del timo, por el reto con péptidos generados de proteínas propias unidos a moléculas MHC. En este proceso, los LT que tengan baja respuesta frente a un péptido presentado por una molécula MHC, entrará en apoptosis en el timo. Si por el contrario el LT responde de manera agresiva frente al mismo péptido, será eliminado por apoptosis y a este proceso se le denomina selección negativa. Las células que sobreviven, generalmente presentan una afinidad intermedia frente al péptido y logran salir a la periferia, proceso que se conoce como selección positiva.

Debido a que no todos los péptidos existentes son presentados al LT en el timo durante la regulación de la tolerancia central, es necesario un segundo control de tolerancia periférica. Ésta se genera cuando el LT circulante se encuentra con un autoantígeno y puede manejarse por diferentes procesos tales como: ignorancia inmunológica, deleción clonal, anergía, inhibición o supresión (Figura 2a y 2 b).

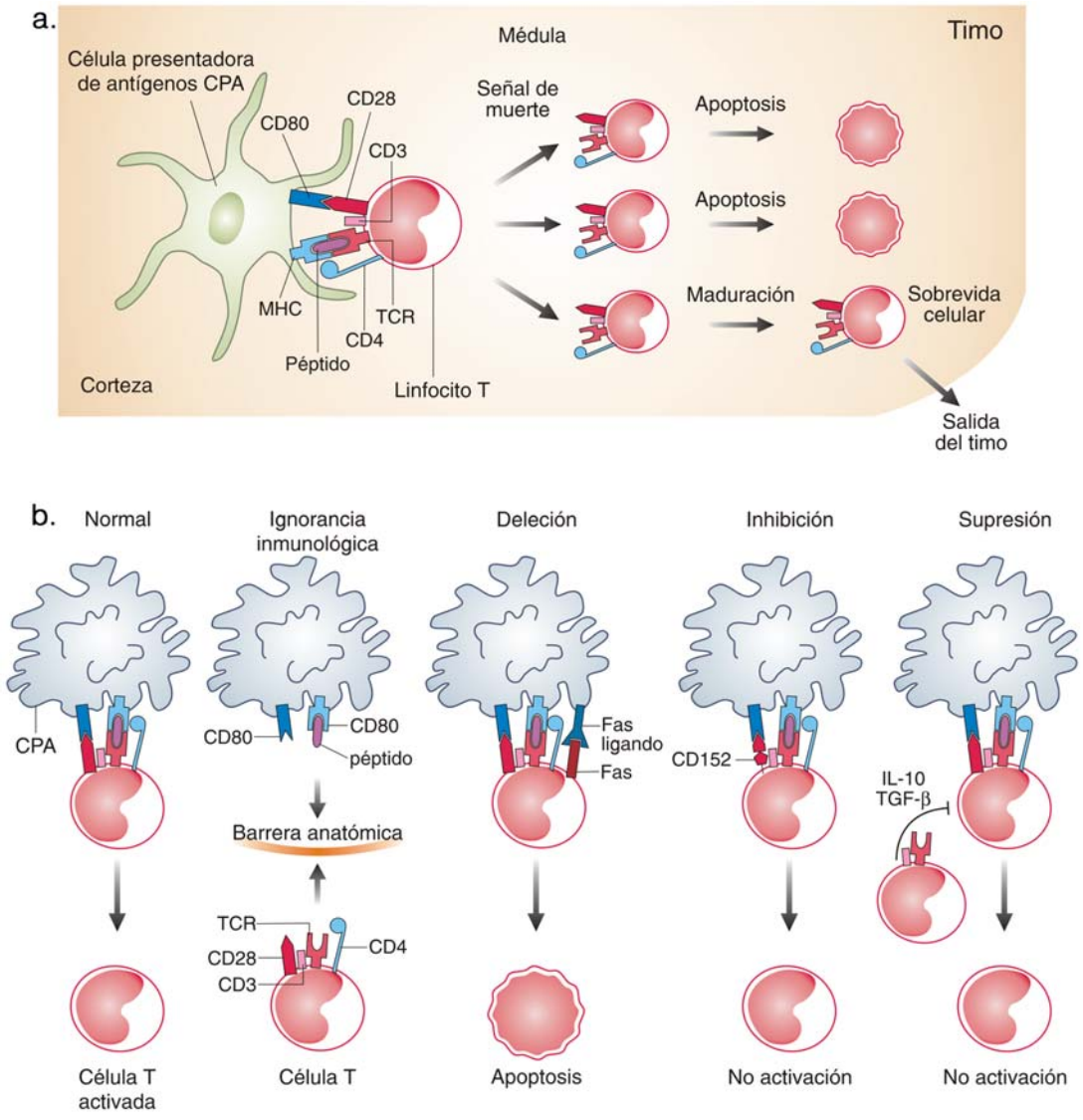


FIGURA 2.
Mecanismos de tolerancia.
a. Tolerancia central, la cual se lleva a cabo en el timo y en la que participa el LT y las CPA. b. Tolerancia periférica, mediada por las barreras anatómicas o procesos de ignorancia inmunológica o inducción de apoptosis o inactivación de linfocitos T autorreactivos. (Adaptada de Kamradt T. N Eng Med et al. 2001).

bargo, los principales protagonistas son los linfocitos, tanto B como T, al igual que las *células presentadoras de antígenos profesionales* (CPA) tales como las células dendríticas, los macrófagos y los LB. Igualmente, las células efectoras cumplen un papel muy importante en este tipo de respuesta.

Los linfocitos son las células encargadas de reconocer y responder de manera específica a los antígenos, además son mediadores de la respuesta inmune humoral y celular. Como se tratará en el siguiente capítulo, hay diferentes subpoblaciones de linfocitos cada una de ellas con una función definida. Por su parte las CPA son las encargadas de dar inicio a las diferentes fases de la respuesta inmune adquirida, ya que son las responsables de capturar el antígeno y presentarlo al linfocito específico, a través de las moléculas HLA clase I y clase II, previo procesamiento antigénico, el cual se trata en el Capítulo 9. Las CPA más especializadas son las células dendríticas, las cuales capturan antígenos microbianos, y los transportan hasta los órganos linfoides, donde son presentados a los linfocitos T vírgenes, para que ellos inicien la respuesta inmune específica propiamente dicha. A pesar de que las CPA profesionales son las directas implicadas en la presentación antigénica, otro tipo de células pueden cumplir esta función en condiciones y fases especiales de la respuesta inmune, y de igual manera pueden desencadenar los mecanismos efectores tanto celulares como humorales. Entre este tipo de células están las células epiteliales y los fibroblastos.

Una vez se genera la presentación antigénica, los linfocitos T son activados y esto desencadenará otra serie de mecanismos que buscan eliminar definitivamente el

antígeno, estos mecanismos son conocidos como efectores, y en ellos el componente celular es altamente importante. A este grupo de células que se les conoce como efectoras, pertenece los LT y LB activados, los fagocitos mononucleares y otros leucocitos como los polimorfo nucleares y las células NK, cuya función está distribuida en diferentes estadios de la respuesta inmune.

Fases de la respuesta inmune adquirida

La respuesta inmune adquirida se ha dividido en varias fases, como son el reconocimiento antigénico que corresponde a la fase inicial de la inmunidad y se desarrolla de manera específica para cada antígeno. Este reconocimiento genera la activación de los linfocitos que entraron en contacto con dicho antígeno, para culminar con el desarrollo de la fase efectora de eliminación del antígeno, que generan los mecanismos fisiológicos de la respuesta. Después de que se elimina el antígeno, la respuesta inmune es menguada y busca recuperar la homeostasis, asegurándose finalmente de conservar la memoria inmunológica (Figura 3).

Reconocimiento del antígeno

Cada individuo posee numerosos linfocitos, generados por expansión de una clona, lo que nos indica que poseen un mismo precursor, capaz de reconocer y responder específicamente a diferentes determinantes antigénicos. Ello asegura que cuando un antígeno ingrese al organismo, una clona preexistente sea seleccionada entre la diversidad de receptores antigénicos que poseen los linfocitos (Caja 2), y que está pueda ser activada para dar respuesta a dicho antígeno (Figura 4). Este concepto se conoce como selección clonal, sugerida inicialmente por Niels Jerne en 1995 y replanteada por Macfarlane Burneo en 1957. Esta hipótesis trata de explicar cómo las células existentes, son seleccionadas por el antígeno que ingresa al organismo para proliferar, generando un rápido incremento en el número de LT y LB que pueden reconocer el antígeno de manera específica. La mayoría de estas respuestas involucran varios clones con una especificidad diferente, para lograr la eliminación efectiva del antígeno, de allí que se diga que la respuesta inmune es policlonal, debido a que cada antígeno puede poseer múltiples epítopes (Fi-

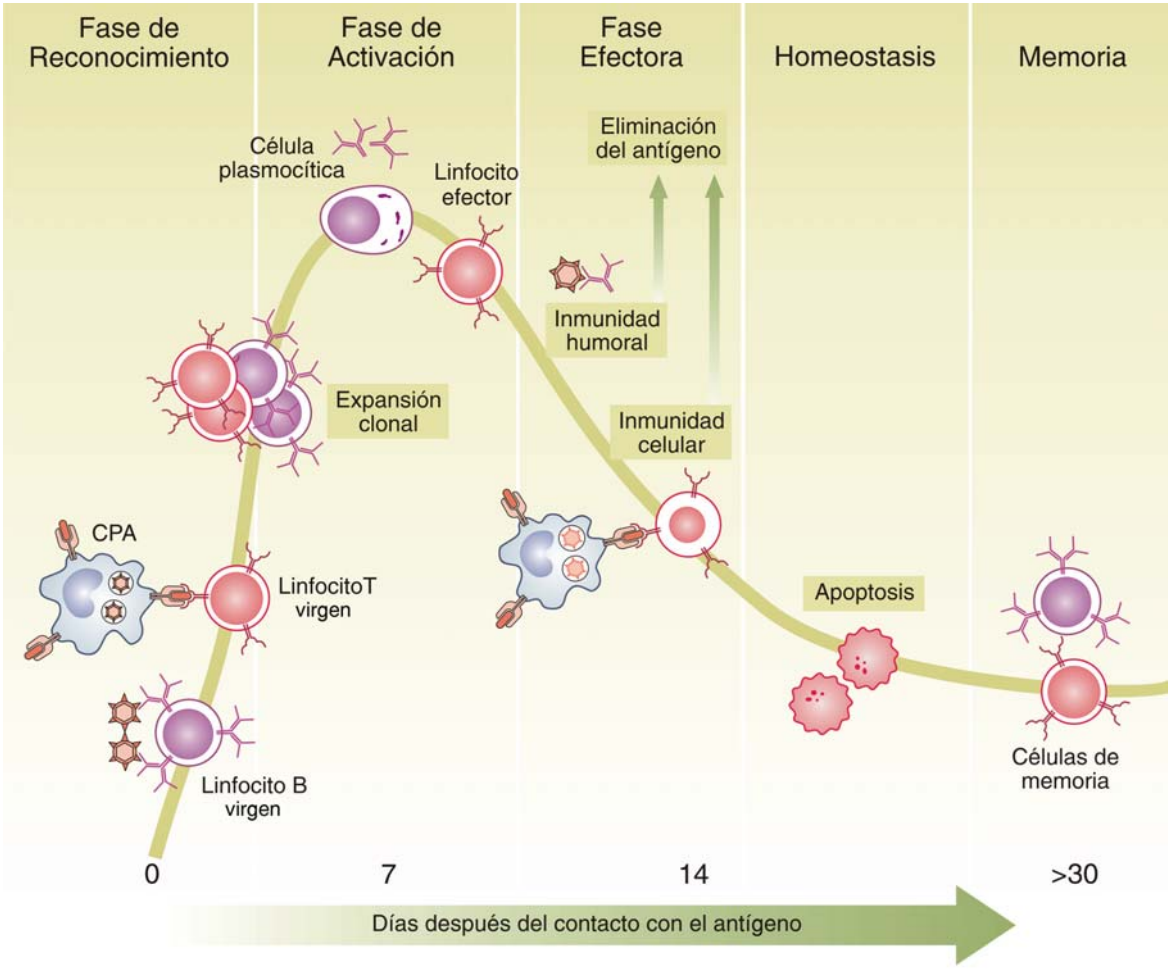


Figura 3.
Fases de la respuesta inmune adquirida.
Las fases de la respuesta inmune adquirida comienzan con el reconocimiento del antígeno, seguida de la activación y fase efectora de los linfocitos T y B, hasta conseguir la homeostasis del sistema inmune y finalmente preservar la memoria inmunológica, característica de la inmunidad adquirida. (Adaptada de Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 2003)

gura 5), cada uno con la capacidad de unirse a un único clon. En el caso de los LB, la selección clonal genera una población de LB con alta afinidad y especificidad contra un antígeno que ha inmunizado un individuo. Durante la respuesta inmune primaria se generan clonas de células T y B efectoras (CD4, CD8 y células plasmáticas) y de memoria. Estas células de memoria son cuantitativa y cualitativamente superiores al generar una respuesta inmune secundaria, luego de encontrarse nuevamente con el mismo antígeno. Se ha podido observar que LT y LB vírgenes, así como también linfocitos de memoria, pueden hacer expansión clonal durante respuestas secundarias, estas clonas, generalmente son diferenciadas por expresar moléculas de superficie celular CD45, propias únicamente de linfocitos vírgenes, esto puede generar un gran número de LT y en el caso de los LB se detectan altos niveles de anticuerpos, comparados con los producidos durante la respuesta inmune primaria.

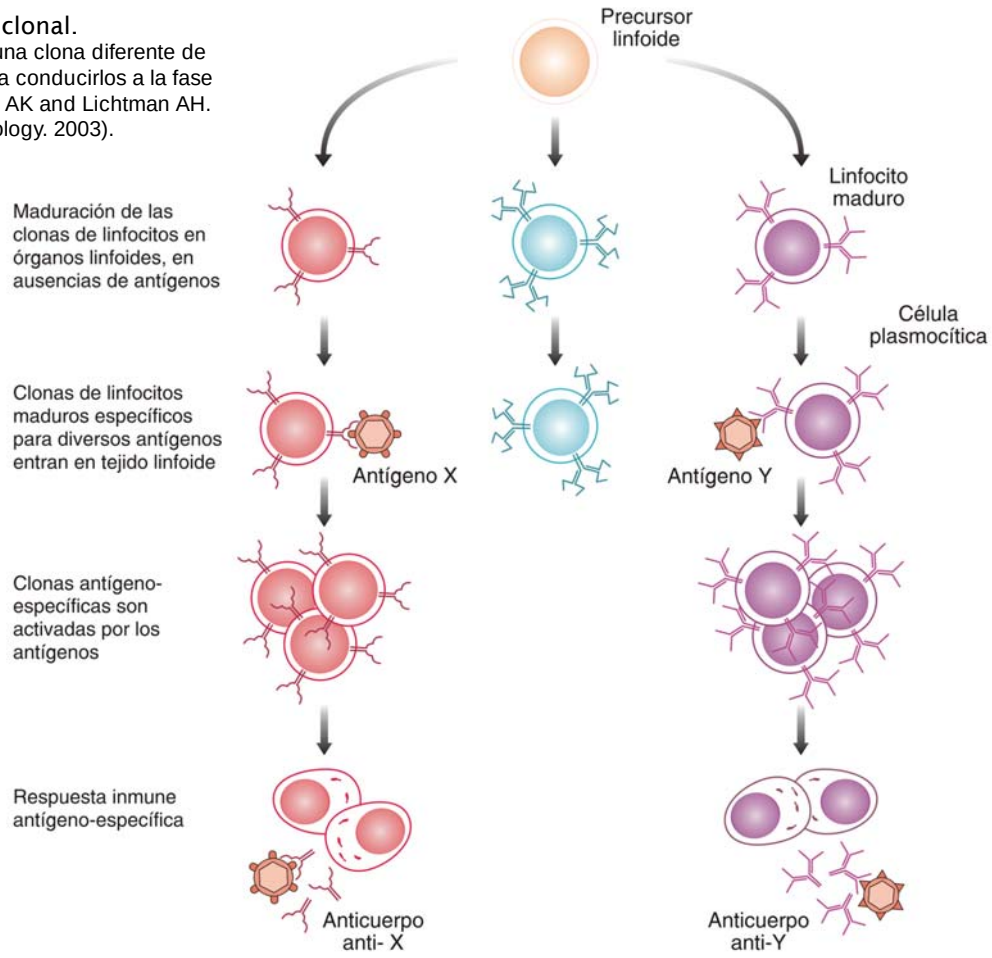
Activación de los linfocitos

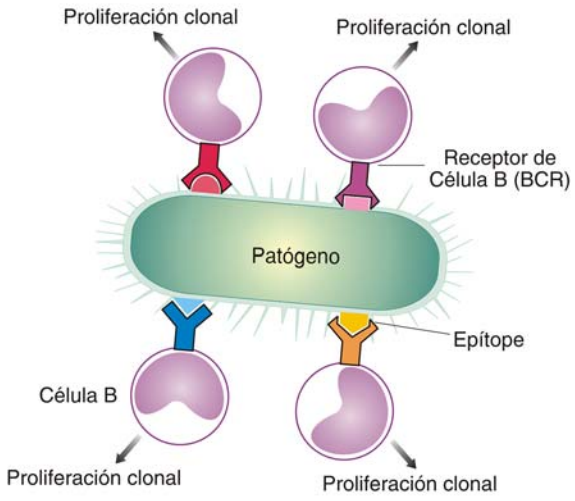
La activación de los linfocitos requiere de dos señales diferentes, la primera es una activación dependiente del antígeno, también llamada señal 1, en la que se asegura que la respuesta inmune será llevada a cabo de manera altamente específica, luego viene la coestimulación o señal 2, en la que se busca la eliminación final del agente agresor, por una interacción entre la inmunidad innata y la específica, esta segunda señal, requiere de un control lo suficientemente estricto como para asegurar que sólo se desarrolle cuando es necesario y que sea autocontrolado para evitar procesos autoinmunes. Estas dos señales se llevan a cabo de manera diferente en los LT y los LB, como se tratará a continuación.

Caja 2. Diversidad de receptores antigénicos

Cuando se habla de diversidad antigénica, se estima que cerca de 10^{15} regiones variables para anticuerpos en los linfocitos B y una cantidad similar de regiones en los receptores de linfocitos T, conforman el arsenal de respuesta inmune específica en cada individuo. Esta amplia diversidad se origina a partir de unos 400 genes diferentes, gracias a un único proceso de recombinación, corte, acoplamiento y modificación de los genes para las regiones variables de los receptores de LB y LT (BCR y TCR respectivamente). Cada linfocito utiliza una recombinación diferente o la unión de diferentes fragmentos de genes para conformar el "código genético" de sus receptores. La secuencia de los receptores generalmente se mantiene inalterada durante la división celular de los LT, pero para los LB es diferente, dado que pueden sufrir rearreglos en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios.

Figura 4.
Hipótesis de la selección clonal.
Cada antígeno puede activar una clona diferente de linfocitos, tanto B como T, hasta conducirlos a la fase efectora. (Adaptada de Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 2003).


Precursor linfoide
Linfocito maduro
Célula plasmocítica
Maduración de las clonas de linfocitos en órganos linfoides, en ausencias de antígenos
Clonas de linfocitos maduros específicos para diversos antígenos entran en tejido linfoide
Antígeno X
Antígeno Y
Clonas antígeno-específicas son activadas por los antígenos
Respuesta inmune antígeno-específica
Anticuerpo anti- X
Anticuerpo anti-Y



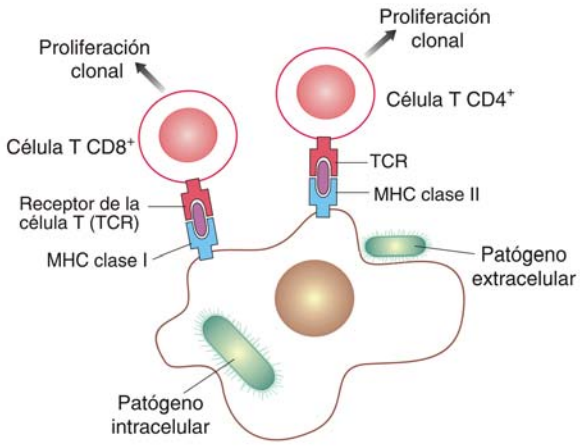


FIGURA 5.
Reconocimiento de Antígenos.
Los linfocitos B y T tienen la capacidad de hacer un reconocimiento molecular de diferentes epitopes del microorganismo o molécula extraña.

Activación de los LT

La activación de los LT conlleva a una expansión clonal y a la diferenciación de células T vírgenes en clonas de respuesta específica. Esta activación se genera luego del primer contacto con el antígeno. Las proteínas antigénicas que ingresan al organismo son capturadas en circulación por las CPA, principalmente las células dendríticas, éstas transportan el antígeno hasta los nódulos linfoides y el bazo, donde presentarán dicho antígeno a los LT vírgenes por intermedio de las moléculas MHC clase I y clase II. El antígeno presentado en el contexto de MHC, es reconocido por el TCR. En este momento, una serie de señales de transducción son dirigidas al núcleo y a otras proteínas expresadas en la superficie del LT como son otras moléculas ayudadoras como el CD4 o CD8 y el CD3 para que se movilicen al sitio de contacto entre la CPA y el LT, este proceso es conocido como *Sinapsis Inmunológica*, por la que se induce al LT a la diferenciación y proliferación, para constituirlo en una célula efectora y célula T de memoria. Con esta serie de eventos se estaría generando la primera señal (Figura 6).

Las moléculas de adhesión, primordialmente las integrinas, estabilizan el encuentro entre la CPA y el LT, para asegurar que sea lo suficientemente largo como para que se induzca, por parte del TCR, las señales necesarias para que se inicie la activación de las moléculas coestimuladoras, presentes en la CPA y de sus receptores, y de esta manera comience la segunda señal. La vía de coestimulación involucra la preactivación de los LT y la expresión de la molécula CD28 en la superficie celular, la cual se une a las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas por las CPA activadas. La interacción entre el CD28 y el B7-1 o 2, induce un gran número de señales, al interior del LT, entre ellas las principales son la sobrevida celular, la síntesis de IL-2 y la diferenciación de células T vírgenes a células T efectoras o de memoria.

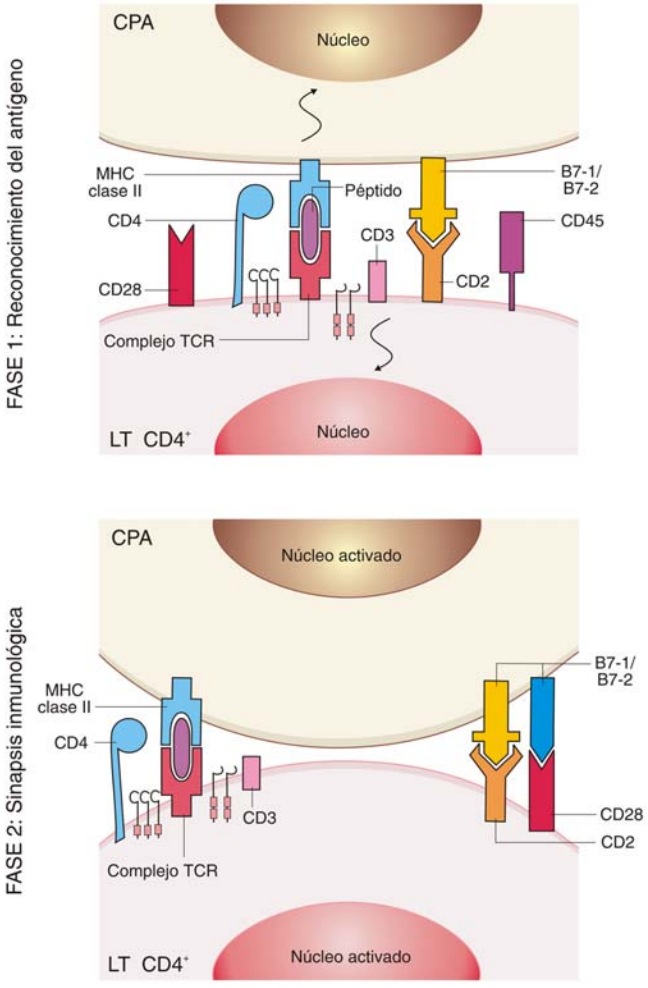


FIGURA 6.
Sinapsis inmunológica.
Fase de reconocimiento del antígeno, en la que intervienen las moléculas MHC y la fase de coestimulación, en la cual se establece el contacto entre la CPA y el linfocito T para establecer la sinapsis propiamente dicha.

La expresión de las moléculas coestimuladoras y sus receptores debe ser lo suficientemente controlada, para que se inicie en el momento y en el lugar correcto. Esta inducción es generada principalmente por productos bacterianos, por el IFN-γ y por la citoquinas expresadas durante la fase de inmunidad innata. Luego de que el linfocito T es activado, comienza la expresión de la molécula CD40 ligando (CD40L), que se une al CD40 expresado por las CPA, generando una señal de inactivación para la expresión de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. Este proceso induce una mayor activación del LT e induce la secreción de IL-12 por parte de la CPA, lo que promueve la diferenciación celular del LT, así el CD40 y el CTLA-4 amplifican indirectamente la respuesta celular (Figura 7).

En ausencia de las señales de coestimulación, las células T pueden encontrar el antígeno pero pueden tomar dos vías: una de ellas es la falla en la activación celular y consecuente apoptosis, o la otras, es que generan un estado de no respuesta conocido como anergía.

Activación del LB

El proceso de activación de los LB comprende una secuencia de fases que comienza en los procesos de maduración de éstos. La activación propiamente dicha se da luego de que el LB reconoce un antígeno específico, el cual es unido a la membrana celular del LB virgen a través de las fracciones Fc de la IgM e IgD. Esta unión activa al LB para proliferar, dando como resultado la expansión clonal de las células antígeno-específicas o células efectoras, responsables de la producción de anticuerpos y las células B de memoria. Algunas células B activadas comienzan a producir anticuerpos diferentes a las IgM e IgD, generando así los diferentes isotipos de Ig y otras pueden genera anticuerpos de alta afinidad que generan una mayor respuesta (Figura 8).

La activación de los LB frente a antígenos proteicos requiere de la colaboración de los LT CD4+, los cuales reconocen el antígeno y luego activan el LB, por esta razón las proteínas son consideradas antígenos timo dependientes o antígenos T dependientes. De otra parte, la respuesta de los LB a antígenos no protéicos, no requiere de la ayuda de LT CD4+ para ser activados, por tanto son T independientes. Tras la activación de la célula B, ésta sufre un proceso de transformación en célula secretora de anticuerpos o célula plasmática, encargada de ir a los órganos linfoides periféricos, desde donde dirige cada isotipo hasta el sitio de la infección a través del torrente sanguíneo o por paso a través de los epitelios. Los LB activados pueden tener una vida media larga, hasta de 20 días después de la exposición al antígeno o pueden convertirse en células B de memoria luego de 30 días de desencadenada la respuesta.

Al igual que los LT, el LB recibe una segunda señal durante el proceso de activación, adicional al reconocimiento del antígeno, que está dado por las proteínas del complemento, las que son activadas por la unión antígeno-anticuerpo en la vía clásica (Capítulo 7). Los LB maduros, expresan el receptor para la fracción C3f del complemento, llamado también receptor tipo 2. El complejo LB-anticuerpo-receptor tipo 2 (CR2), se unen a través de la Ig y forman un segundo complejo con las moléculas CD19 y CD81 (TAPA-1), formando el complejo denominado correceptor del LB, para enviar señales de activa-

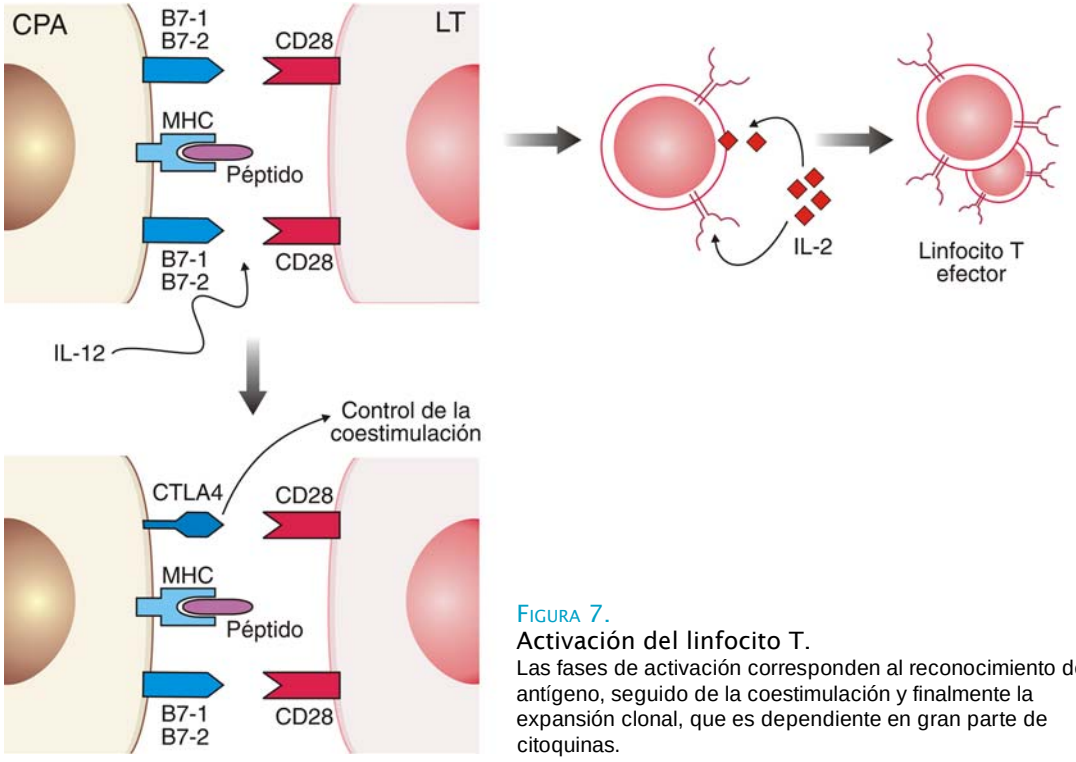


FIGURA 7.
Activación del linfocito T.
Las fases de activación corresponden al reconocimiento del antígeno, seguido de la coestimulación y finalmente la expansión clonal, que es dependiente en gran parte de citoquinas.

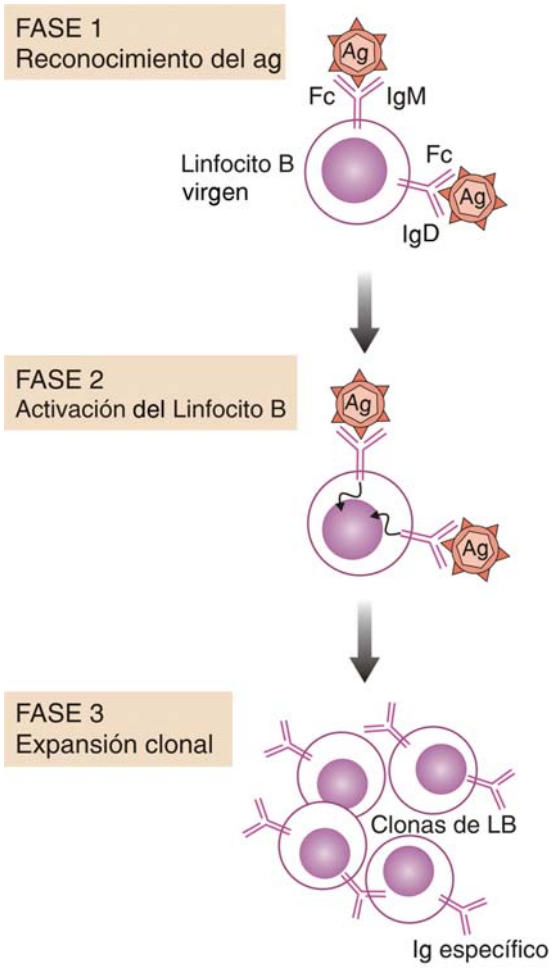


FIGURA 8.
Activación del linfocito B.
El linfocito B depende bien sea del reconocimiento del antígeno directamente o por activación proveniente del linfocito T CD4+, seguido del contacto entre la Ig y el epítope antigénico, para terminar en la expansión clonal.

ción celular que dan la orden al LB de liberar la Ig específica, para que ésta se una a la superficie de la membrana celular del antígeno e induzca la lisis antigénica. Al mismo tiempo, el complejo TAPA-1 puede interactuar con el receptor del LB (BCR), para potenciar la activación y respuesta de los LB (Figura 9).

Fase efectora y eliminación del antígeno

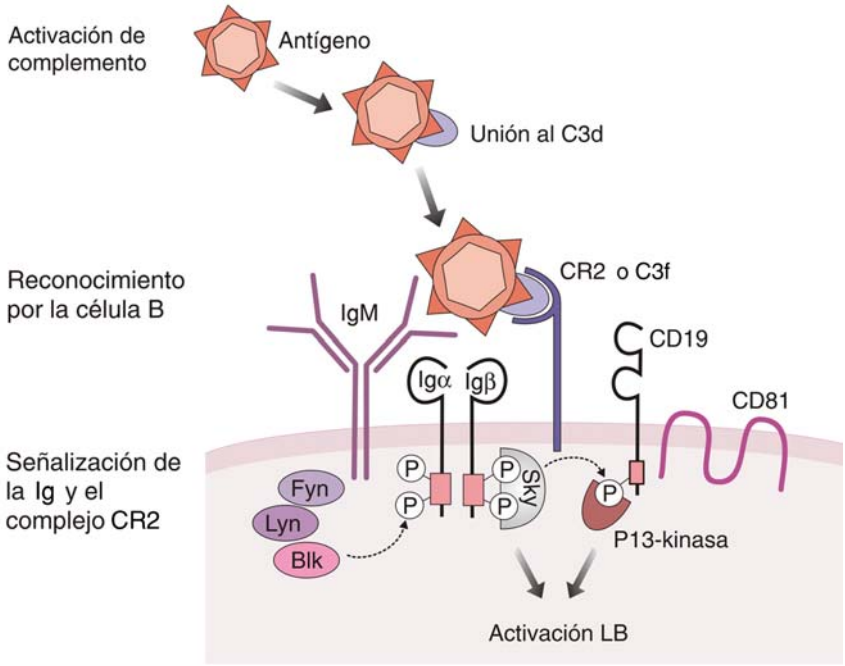
Los Linfocitos T y B activados deben pasar a la fase de eliminación de los antígenos, tanto de origen extracelular como intracelular, por medio de la citotoxicidad y la síntesis de anticuerpos, como se tratará más adelante.

Homeostasis

Una vez generados los mecanismos efectores por parte de los linfocitos, las CPA y los fagocitos, así como las moléculas colaboradoras (Igs,IL-2, IL-12, CTLA4, etc.) encargadas de eliminar el antígeno, la respuesta inmune debe comenzar a declinar, hasta volver a su estado basal. Uno de los procesos más importantes en esta homeostasis es la muerte por apoptosis de un gran número de linfocitos tanto T como B, luego de que cumplieron su función. Esto sugiere que gran parte de la sobrevida de los linfocitos depende de los factores inductores de crecimiento y proliferación generados por el antígeno, así como por la presencia misma de dicho antígeno.

Una vez regulada la cantidad de células activadas durante la respuesta inmune, se generará por consiguiente una disminución gradual de las citoquinas y otras moléculas producidas durante la fase activa de la respuesta, para asegurar que no se producirán efectos adversos tales como la inflamación crónica y la autoinmunidad, en las cuales hay síntesis constantes y desordenada de un sin número de citoquinas y componentes inmunológicos de tipo proinflamatorio (TNF-α, IL-1, proteínas de fase aguda, etc.).

FIGURA 9.
Activación del linfocito B por la vía del complemento.
(Adaptada de Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 2003).



Mecanismos efectores de inmunidad adquirida

Función efectora del linfocito T (inmunidad celular)

Las células T CD4+ son principalmente células ayudadoras, las cuales estimulan la producción de citoquinas y favorecen la activación de otras células que participan en la respuesta inmune, principalmente LB. Por su parte, las células T CD8+ son citotóxicas. Las células T CD4+ pueden ser subdivididas en dos grupos grandes conocidos como células T ayudadoras tipo 1 (Th1), cuya característica primordial es la síntesis de interleuquina 2 (IL-2) e interferón gama (IFN-γ), pero no de IL-4, 5 o 6, y células T ayudadoras tipo 2 (Th2), las cuales secretan IL-4, 5, 6 y 10 pero no IL-2 ni IFN-γ (Figura 10).

Las citoquinas producidas o estimuladas por los linfocitos T tienen su papel principal sobre el tipo de respuesta inmune óptima, necesaria para eliminar los agentes infecciosos, para normalizar los procesos alérgicos y evitar el desarrollo de respuestas autoinmunes (Tabla 2). En el caso de la estimulación de LT por parte de las CPA, hay una

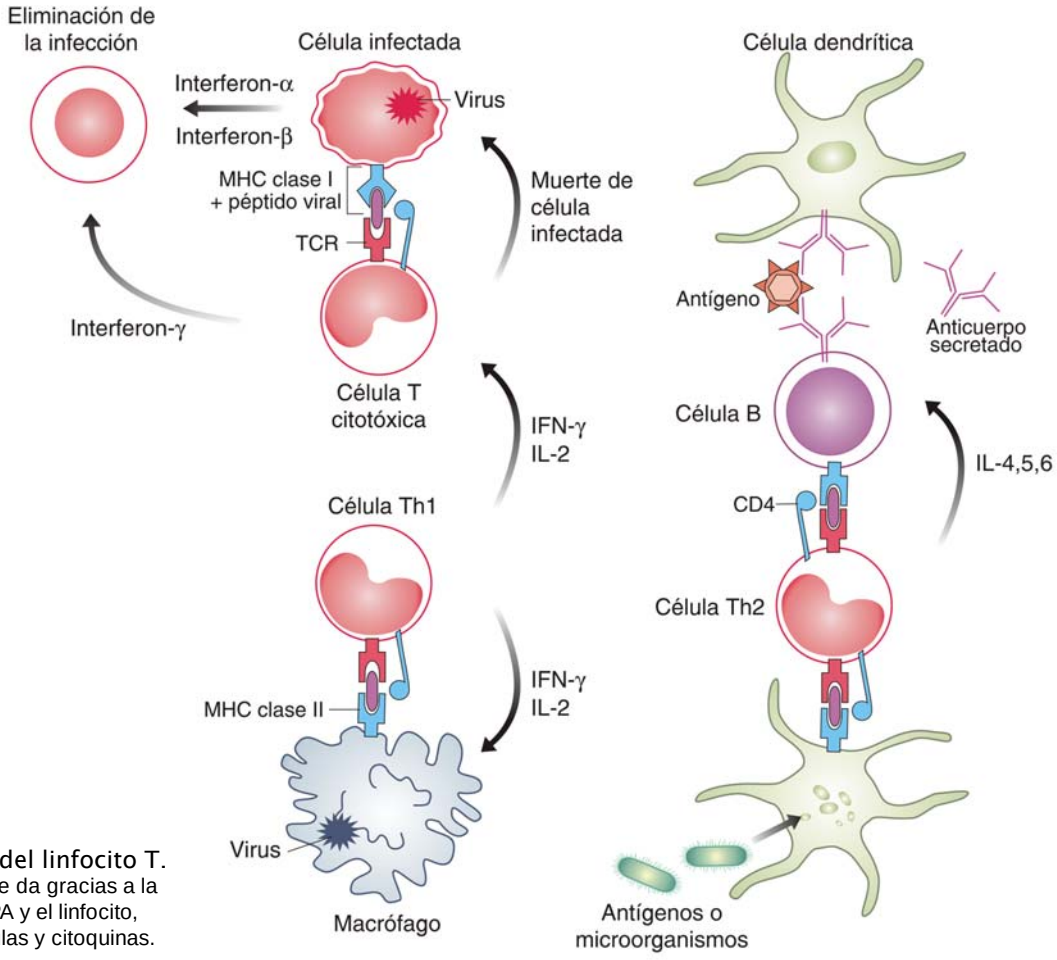


FIGURA 10.
Función efectora del linfocito T.
La función efectora se da gracias a la interacción de las CPA y el linfocito, por medio de moléculas y citoquinas.

TABLA 2. **Citoquinas producidas por los LT en respuesta inmune adquirida.**

Citoquina	Fuente principal	Efecto biológico
Interleuquina 2 (IL-2)	Células T	Proliferación celular, activación y síntesis de mediadores de apoptosis
Interleuquina 4 (IL-4)	Células T CD4+, tipo Th2	Cambio de isotipo de Ig, diferenciación a células Th2, Proliferación de macrófagos.
Interleuquina 5 (IL-5)	Células T CD4+, tipo Th2	Proliferación de LB e inducción de la síntesis de IgA
Interferón gama (IFN-γ)	Células T CD4+, tipo Th1	Incremento de la expresión de moléculas HLA y presentación antigénica, inducción y activación de células, diferenciación a células Th1
Factor de crecimiento y transformación β (TGF-β)	Células T	Inhibición de la proliferación celular y de la síntesis de Ig
Linfotoxinas (LT)	Células T	Reclutamiento y activación celular
Interleuquina 13 (IL-13)	Células T CD4+, tipo Th2	Inhibición de macrófagos y cambio al isotipo IgE

inducción de síntesis de IL-12, la cual activa, a su vez, la producción de IFN-γ, generando un patrón de respuesta tipo Th1, cuya característica será estimular eficientemente la acción de los macrófagos, para promover los procesos de fagocitosis e inflamación, que se llevan en conjunto con la respuesta inmune innata.

En resumen, la activación de LT para generar un patrón de citoquinas, del tipo Th1, facilita la respuesta inmune mediada por células, incluyendo la activación de macrófagos y citotoxicidad mediada por LT CD8+. La estimulación, en cambio de LT que generen un patrón de citoquinas del tipo Th2, activará preferiblemente los LT CD4+ y se producirá una respuesta inmune con fuerte activación de los LB e inducirá la síntesis de anticuerpos (Figura 11a y b).

Función efectora del linfocito B (inmunidad humoral)

Cuando las células B sufren la diferenciación terminal a célula plasmática, ellas adquieren la capacidad de producir y secretar altos niveles de anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser de varios tipos, tales como IgA, IgG, IgM, IgE e Ig, y cumplen varias funciones, que incluyen: 1. Protección, en el caso de que se unan a la membrana celular de los microorganismos o a la estructura de algunas toxinas, para prevenir la unión de éstos con los respectivos receptores de la células que puede ser susceptible a la infección, 2. Activación del complemento, a través de la activación de la vía clásica, interactuando con la fracción C1q, asociándola con la porción Fc de las IgM e IgG, en la superficie celular. Esta unión lleva a la activación completa del complemento, generando estimulación de los procesos de fagocitosis y lisis de los microorganismos.

En otras circunstancias, cuando hay ausencia del complemento, algunos anticuerpos del tipo IgG, IgA o IgE pueden unirse directamente a receptores Fc (Capítulo 5) de la célula fagocítica, e igualmente favorecer la destrucción de los agentes agresores. Por su parte, anticuerpos como los IgG e IgE pueden mediar un proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), un proceso adicional de lisis celular en el cual pueden participar un gran número de células del sistema inmune. En el caso de las células NK, monocitos, macrófagos y neutrófilos, la ADCC está medida por la IgG, mientras que en eosinófilos y plaquetas está inducida principalmente por IgE. La ADCC es uno de los mecanismos efectores más significativos de los LB, ya que puede interactuar con un sinnúmero de vías de respuesta inmune,

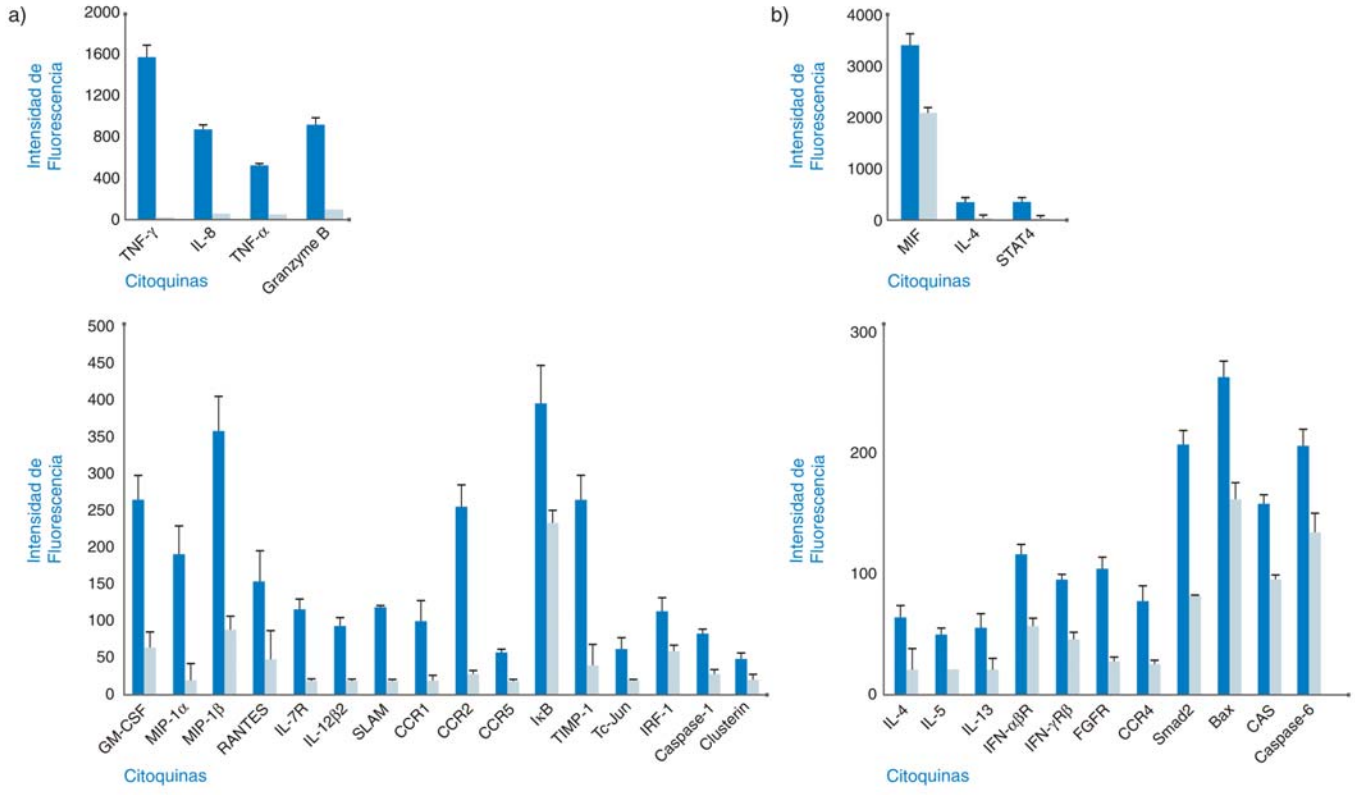


FIGURA 11.
Patrón de citoquinas Th1 y Th2.
a. Citoquinas expresadas en la respuesta inmune adquirida tipo Th1, en el eje X se pueden observar las citoquinas que se expresan, mientras el eje Y indica los niveles de expresión según la emisión media de fluorescencia. b. Citoquinas expresadas en la respuesta inmune adquirida tipo Th2, en el eje X se pueden observar las citoquinas que se expresan, mientras el eje Y indica los niveles de expresión según la emisión media de fluorescencia. (Adaptada de Hamalainen H. et al. Genome Biology. 2001).

como es el caso del estímulo de la fagocitosis, induciendo síntesis de perforinas, granzimas e intermediarios del oxígeno.

Inmunidad adquirida y autoinmunidad

Como se ha venido observando a lo largo del capítulo, la inmunidad adquirida es uno de los principales procesos en los cuales se puede desencadenar autoinmunidad. Sin embargo, cabe anotar que durante un cierto tiempo y bajo condiciones específicas, esta autoinmunidad puede ser fisiológica durante la respuesta inmune específica, dado que en años recientes se ha podido observar que la tolerancia a los componentes propios no es absoluta. Debido a la gran diversidad proteica y molecular de los agentes patógenos, un sistema inmune que haya sido desprovisto de todo su potencial autorreactivo, probablemente tampoco podría enfrentar ningún agente invasor, menos aún si se tiene en cuenta la homología que puede haber entre sus proteínas y las humanas, por esto se plantea que la eliminación de las células autorreactivas está dirigida contra aquellas células altamente respondedoras, ya que las de baja reactividad pueden ignorar los antígenos propios, por que son reconocidos con baja afinidad. Actualmente el reconocimiento de moléculas propias puede ser concebido como un fenómeno fisiológico, distinguible de la enfermedad autoinmune.

La inmunidad adquirida parece ser la mayor implicada en el proceso autoinmune, principalmente en la activación de LT autorreactivos y la inducción de citoquinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras, no obstante la enfermedad autoinmune continúa teniendo un origen desconocido que involucra múltiples fases de la respuesta inmune, en las cuales se genera un claro desbalance entre la estimulación y la atenuación de la respuesta, como se tratará en la mayoría de los capítulos siguientes.

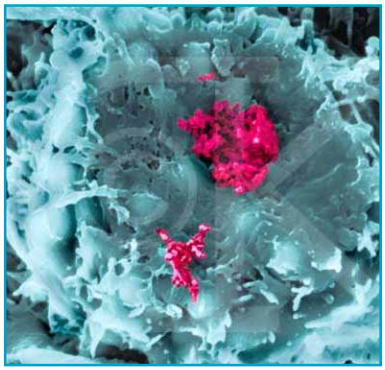
Lecturas recomendadas

1. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System, first of two parts. N Engl J Med 2000; 343:37-49
2. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System, Second of two parts. N Engl J Med 2000; 343:108-117
3. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology.New York, NY: W.H. Freeman Co, 2000
4. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med 2001:344:655-664
5. Bromley SK, Buracky WR, Johnson KG et al. The Immunological Synapse. Annu Rev Immunol 2001. 19:375–96
6. Dustin ML. The Immunological synapse. Arthritis Res 2002; 4 (suppl 3):S119-S125
7. Chaplin DD. The immune system.Overview of the immune response. J allergy Clin Immunol 2003;111:S442-59
8. Abbas AK and Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, PA: Saunders Co, 2003
9. Stassen M, Fondel S, Bopp T et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins > 4 I 7 or > 4 I 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. Eur J Immunol 2004; 34: 1303–1311

7

LINFOCITOS B Y T

Luz Elena Cano R.



Contenido

Ontogenia
Linfocitos T
- Receptor T
- Moléculas coestimuladoras
- Moléculas de adhesión en linfocitos T
- Mecanismo de señalización
- Linfocitos T αβ
- Linfocitos T γδ

Linfocitos B
- Receptor B
- Moléculas coestimuladoras
- Moléculas de adhesión en linfocitos B
- Mecanismo de señalización

Los linfocitos T y B son células que están involucradas en la respuesta inmune de tipo adquirido o antígeno específica, son consideradas las únicas células del organismo capaces de reconocer y responder de manera específica a los antígenos. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos y de ellas depende la inmunidad de tipo humoral; en contraste, la inmunidad celular depende de los linfocitos T. En el presente capítulo se resumen las principales características de estas células, efectoras del sistema inmune, se definen las diferentes subpoblaciones de cada una, los mecanismos de señalización y sus principales funciones

Introducción

Los linfocitos T y B son células que están involucradas en la respuesta inmune de tipo adquirido o antígeno (Ag)-específica, son consideradas las únicas células del organismo capaces de reconocer y responder de manera específica a los Ags. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos y de ellas depende la inmunidad de tipo humoral; en contraste, la inmunidad celular depende de los linfocitos T.

Desde el punto de vista morfológico, los linfocitos T y B son indistinguibles, son células de tamaño pequeño (8 - 10 micras de diámetro), poseen un gran núcleo con heterocromatina densa y borde de citoplasma que contiene pocas mitocondrias, ribosomas y lisosomas. Cuando son activadas por el estímulo antigénico pueden aumentar un poco de tamaño, incrementando su porción citoplasmática y el número de organelas.

Ambos tipos de linfocitos (T y B) presentan en su superficie receptores para Ag con diferente especificidad. Los genes que codifican para estas estructuras sufren una serie de recombinaciones del DNA lo cual les permite una inmensa diversidad fenotípica.

En la Tabla 1 se resumen las características más importantes de cada una de las subpoblaciones (linajes) de linfocitos (Tαβ, Tγδ y B).

Ontogenia

Este proceso parte de las células pluripotenciales (SC, stem cells) presentes en la medula ósea del hospedero y donde, dependiendo de los estímulos de las proteínas *Notch* (N), se originarán los linfocitos T y B. En presencia de *Nocth-1* (N1) se induce el progenitor tímico temprano (ETP, early thymic progenitor), a partir del cual se derivarán todas las subpoblaciones de linfocitos T. Por el contrario, en ausencia de N1 se induce el progenitor linfoide temprano (ELP, early lymphoid progenitor), de donde se derivarán los linfocitos B. En la Figura 1 se resumen los múltiples y complejos mecanismos, células y moléculas que participan en la ontogenia de los linfocitos.

Las proteínas *Notch* son receptores transmembrana, evolutivamente conservados, en mamíferos se han identificado hasta la fecha 4 miembros (N1 – 4), se expresan en la superficie celular como heterodímeros y al unirse con el respectivo ligando induce el clivaje de su porción citoplasmática la cual se transloca al núcleo y se une a factores de trascripción activando la célula correspondiente. El papel de estas proteínas N en la diferenciación de los linfocitos es crucial. El estroma del timo presenta gran cantidad de ligandos para N lo cual facilita la localización y diferenciación de los ETP en el timo (1,2). El ETP inicia en el timo el rearreglo y expresión de los genes β, γ y δ del receptor de células T (TCR); en este momento no expresa ni CD4 ni CD8 (doble negativa, DN) y pasa a ser célula Pro-T. Existe, a partir de esta célula, una diferenciación que puede ser: a) hacia linfocito Tγδ, donde aun está en controversia la influencia de algunas de las molécula N (N?); o b) linfocito Pre–T, el cual, gracias al proceso de *selección β*, expresa la cadena β y una pre-α formando un preTCRαβ. Este paso presenta marcada influencia de la N1 (1,2).

Posteriormente la célula Pre-T expresa los marcadores CD4 y CD8 quedando una célula doble positiva (DP) y expresa también la cadena α del TCR para formar el verdadero TCR αβ. Se da entonces la *selección positiva,* que es el proceso por el cual las células DP TCRαβ+ que se unen con baja afinidad a péptidos propios presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobreviven, mientras que aquellas que no son reconocidas mueren por apoptosis. Este proceso asegura que los linfocitos T maduros sean restringidos al MHC siendo los compatibles con el MHC de clase I CD4-CD8+ y los compatibles con los de clase II CD4+CD8-. Otro proceso que se lleva a cabo es denominado *selección negativa,* por medio del cual las células que reconocen con alta avidez o afinidad los péptidos propios son también eliminadas, asegurando así la destrucción de células potencialmente autorreactivas. Finalmente, se tienen en el timo células T αβ con un solo marcador CD4+ o CD8+, las cuales saldrán

Tabla 1. Características de los diferentes linajes de linfocitos.

Característica	Linfocitos T αβ	Linfocitos T γδ	Linfocitos B
Configuración del receptor para antígeno	Complejo CD3 + TCR αβ	Complejo CD3 + TCR γδ	Ig
Número teórico de receptores	~ 10^{15}	~ 10^{20}	~ 10^{11}
Reconocimiento del antígeno	Péptido + MHC	Proteína y no proteína	Proteína y no proteína
Restricción por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)	Si	Rara	No
Fenotipo	CD4+ ó CD8+	La mayoría son CD4-CD8-; algunos intraepiteliales son CD8αα+	CD19+ CD20+
Frecuencia en sangre	65 – 75 %	1 – 5 % en sangre; 25 – 60 % en intestino	5 – 10 %
Distribución	Sangre y tejido linfoide	Sangre, epitelio y tejido linfoide	Sangre y tejido linfoide
Capacidad efectora	Citotóxica (CD8+); liberación de citoquinas (Th1/Th2)	Citotóxica (CD8+); liberación de citoquinas (Th1>Th2)	Producción de Igs.
Función	Protección inmune y erradicación de patógenos	Inmunorregulación	Inmunidad humoral

Adaptado de ref. 15.

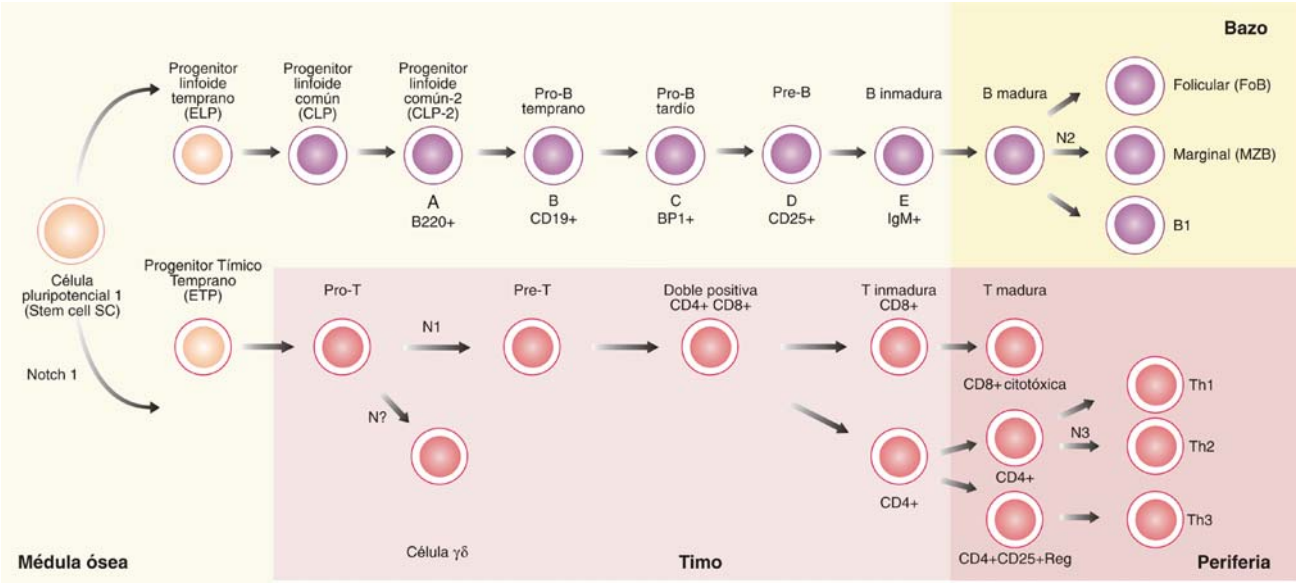


FIGURA 1.
Ontogenia de linfocitos T y B.

a la periferia para madurar en los tejidos linfoides periféricos donde serán activadas y sufrirán proliferación y diferenciación (3,4,5). La diferenciación de células T CD4+ hacia Th1 o Th2 está determinada por el patrón de citoquinas presente (IL-12, IL-18 e IFN-γ para Th1 e IL-4 para Th2) y, adicionalmente, por la señalización de Notch-3 que favorece el desarrollo de Th1 (2). Las células T CD4+ pueden además diferenciarse a una tercera subpoblación denominada linfocitos T reguladores (Treg) y fenotípicamente caracterizados por los marcadores de superficie CD4+CD25+. Esta diferenciación está igualmente determinada en parte por la N3 (2).

En cuanto a la diferenciación de los linfocitos B, éstos provienen del progenitor linfoide temprano (early lymphoid progenitor, ELP) el cual pasa a progenitor linfoide común, de donde se derivan por un lado para células naturales asesinas (NK) y células dendríticas y, por otro, para progenitor linfoide común-2 (CLP-2), responsable del linaje de células B, considerado el primer estadío del linfocito B inmaduro. Se han descrito cinco estadíos de célula B inmadura (A, B, C, D y E). El CLP-2 corresponde al estadío A, presentando expresión del marcador B220+; el estadío B corresponde a célula Pro-B temprana con expresión de CD19+. El estadío C con la célula Pro B tardía expresa BP1+. Durante el estadío D se expresa un prereceptor B convirtiendo la célula en Pre-B con expresión de CD25+. Finalmente, el estadío E corresponde a una célula B inmadura con expresión de IgM+, la cual sale de la médula ósea hacia el bazo donde se dará el proceso de maduración de la célula así como su diferenciación (2). En el bazo la célula B madura se diferencia en tres tipos: 1. célula B folicular (FoB), 2. célula B marginal (MZB), la cual está fuertemente influenciada por las proteinas N2 y 3. células B B1, la cual puede ser B1a o B1b (2,6). Posterior a la interacción de la célula B madura con el antígeno especifico a través del BCR, las diferentes células B maduras se trasforman en plasmocitos o células secretoras de anticuerpos y en células de memoria, ambas responsables de la respuesta inmune de tipo humoral.

Linfocitos T

Los linfocitos T son células sanguíneas mononucleares derivadas de medula ósea que, como ya se mencionó, maduran en el timo (de donde proviene su designación de linfocitos "T") y se distribuyen a los diferentes tejidos linfoides periféricos y el torrente circulatorio. De acuerdo a su receptor que reconoce de manera específica el Ag se dividen tempranamente en células γδ y células T propiamente dichas o αβ. Los linfocitos T αβ presentan diferentes correceptores y según el co-receptor que expresen se dividen en células T CD4+ y CD8+. Las primeras se les conoce como células T ayudadoras (helper, Th) y pueden ser de tipo 1 (Th1) o de tipo 2 (Th2). Existe otra subpoblación de células T, denominada Th3, que hacen parte de las Treg inducidas en la periferia (Figura 2) (6). Las células T CD8+ se les conocen también como células citotóxicas.

Receptor T (TCR)

Se le considera como el marcador molecular definitivo para los linfocitos T. Este complejo molecular se presenta como uno de dos diferentes heterodímeros, αβ o γδ, cada uno está constituido por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, presentan especificidad de antígeno, y ambos son expresados en unión con el complejo no polimórfico CD3 γ, δ, ε, ζ. Los polipéptidos del CD3, especialmente la cadena ζ, son críticos para las vías de señalización intracelular. Todas las cadenas polipeptídicas del TCR (α, β, γ, y δ) presentan una estructura primaria similar con regiones variables (V), de diversidad

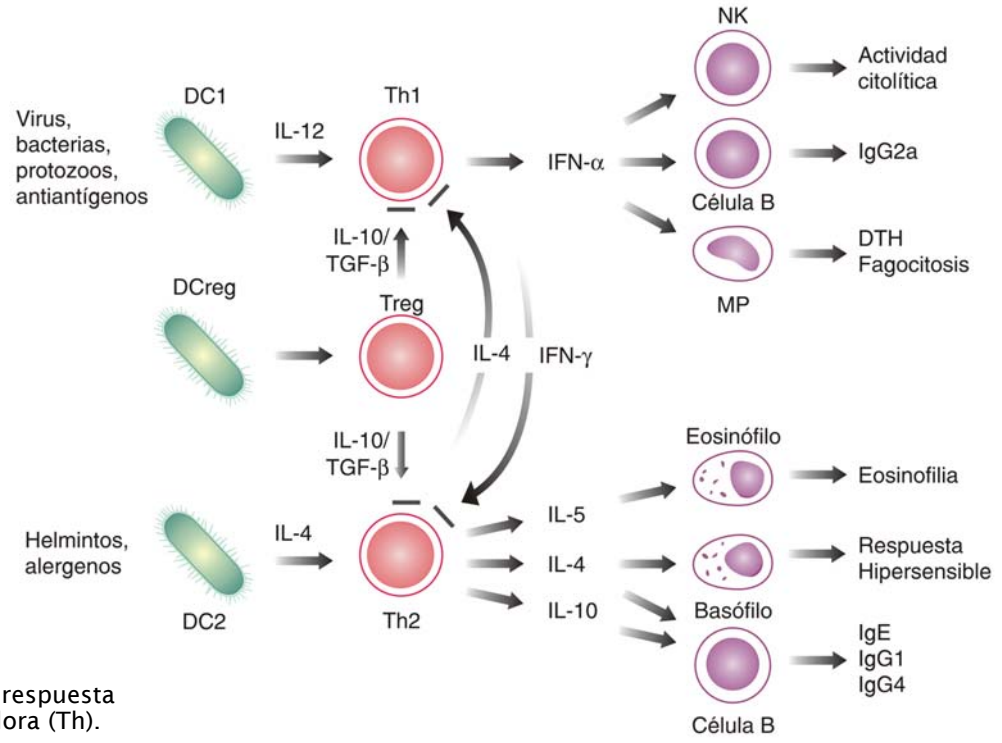


FIGURA 2.
Diferenciación de la respuesta linfocitaria T ayudadora (Th).

(D), de unión (J) y constantes (C). La localización cromosomal de los diferentes loci del TCR es resumida en Tabla 2.

Los genes del TCR están organizados de manera similar a los de las inmunoglobulinas y parecen tener la misma maquinaria de recombinación responsable para la unión de los diferentes segmentos V, D, J y C. Presentan secuencias conservadas de siete y nueve nucleótidos adyacentes a las regiones V, D y J con espacios de 12 a 23 nucleótidos entre ellas; estas secuencias parecen ser esenciales para los procesos de recombinación (3).

El heterodímero TCR αβ es la forma predominante y sólo reconoce de manera específica epítopes (antígenos) que han sido fragmentados (procesados) a partir de la molécula original y que deben ser presentados en la superficie de células no-linfoides (células presentadoras de antígeno, CPA). Estos epítopes son generalmente péptidos que, dependiendo de su tamaño y origen, están unidos a moléculas del MHC de clase I (al que se unen péptidos pequeños de 8 a 10 aa de origen intracelular) o de clase II (que unen péptidos de 13 a 25 aa de origen extracelular). Las moléculas del MHC de clase I en el ser humano están representadas por los antígenos de histocompatibilidad humana (HLA) -A, -B, y C y en el ratón por el H-2K, -D y -L; las de clase II son los HLA-DP, -DQ y DR para el humano y H-2 I-A e I-E para el ratón.

TABLA 2. Localización cromosomal de los loci α/δ, β y γ.

Gene	Ratón	Humano
TCR α/δ	14 C - D	14q11 - 12
TCR β	6B	7q35
TCR γ	13A 2 - 3	7p15

Moléculas coestimuladoras de linfocitos T

Se define una molécula coestimuladora como aquella molécula de superficie que por si misma no es capaz de activar funcionalmente a las células T, pero que puede amplificar o reducir de manera significativa la señalización inducida por el complejo del receptor TCR (7). Durante los últimos años han sido identificadas numerosas moléculas coestimuladoras de la célula T y sus respectivos ligandos (Tabla 3). Solo tres (CD28, CD27 y HVEM) son expresadas de manera constitutiva y la otra gran mayoría son inducibles, expresándose sólo después de la activación dada por el reconocimiento antigénico por el TCR. Todas las moléculas constitutivas tienen un efecto regulador positivo, mientras que las inducibles pueden tenerlo positivo (ICOS, CD30, OX40, 4-1BB, SLAM) o negativo (CTLA-4, PD-1, BTLA). Casi todas son expresadas en células presentadoras de Ag profesionales (CPA) tales como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B.

Aunque la mayoría de las células coestimuladoras se comportan como monógamas (solo un ligando), algunas, como el CD28 y el PD-1, presentan más de uno. Adicionalmente, algunas pocas, como aquellas de la familia de las SLAM, interactúan de manera homotípica reaccionando con moléculas idénticas. Casi todas las moléculas coestimuladoras de las células T pertenecen a la superfamilia de CD28/B7 o a la TNF/TNFR (7,8).

Existe una jerarquía en el funcionamiento de estas moléculas coestimuladoras. Por ejemplo, se ha observado que la coestimulación con CD28 aumenta de manera significativa la inducción de ICOS en la superficie de la célula T (9). Lo mismo ocurre con OX 40 (10).

La expresión de estas moléculas coestimuladoras se da de manera preferencial de acuerdo a la localización de la

Tabla 3. Expresión de moléculas co-estimuladoras en las células T.

Linfocito T				Célula Presentadora de Ag (CPA)						Superfamilia
				Profesional			No Profesional			
Expresión	Señal	Receptor	Ligando	DC	B	Mø	Endotelial	Epitelial	Otras	
Constitutiva	Positiva	CD28	B7-1 (CD80)	+	+	+	_	_	_	CD28 / B7
		CD28	B7-2 (CD86)	+	+	+	_	_	_	CD28 / B7
		CD27	CD70	+	+	+	_	+	+	TNF / TNFR
		HVEM	LIGHT	+	+	+	_	+	+	TNF / TNFR
Inducible	Positiva	ICOS	ICOS – L	+	+	+	+	+	+	CD28/B7
		CD30	CD30 L (CD 153)	_	+	+	_	+	+	TNF / TNFR
		OX40 (CD134)	OX40 L	+	+	+	_	_	+	TNF / TNFR
		4-1BB (CD137)	4 – 1BBL	+	+	+	_	_	+	TNF / TNFR
		SLAM (CD150)	SLAM (CD150)	+	+	+	_	_	_	Ig
	Negativa	CTLA – 4	B7 – 1 (CD80)	+	+	+	_	_	_	CD28 / B7
		CTLA – 4	B7 – 2 (CD86)	+	+	+	_	_	_	CD28 / B7
		PD – 1	PD – L1	+	+	+	+	+	+	CD28 / B7
		PD – 1	PD – L2	+	_	+	+	+	_	CD28 / B7
		Desconocido	B7 – H3	+	+	+	_	+	+	CD28 / B7
		BTLA	B7 – H4 (BTLA–L)	_	+	+	_	_	_	CD28 / B7

Adaptado de ref. 7

célula T, existiendo diferencia entre el repertorio de moléculas para la coestimulación central, la endotelial y la periférica (Figura 3).

Moléculas de adhesión en linfocitos T

El proceso de adhesión se da principalmente durante la extravasación de las células T desde el torrente circulatorio al tejido. Dicho proceso comprende varios pasos consecutivos y es conocido como la cascada de adhesión. Existe, además, una expresión diferencial de moléculas de adhesión dependiendo del estado de activación del linfocito T (en reposo, efector o de memoria) y del sitio (expresión local) donde éste se encuentre (nódulo linfático periférico, placas de Peyer, nódulo linfático mesentérico, piel, in-

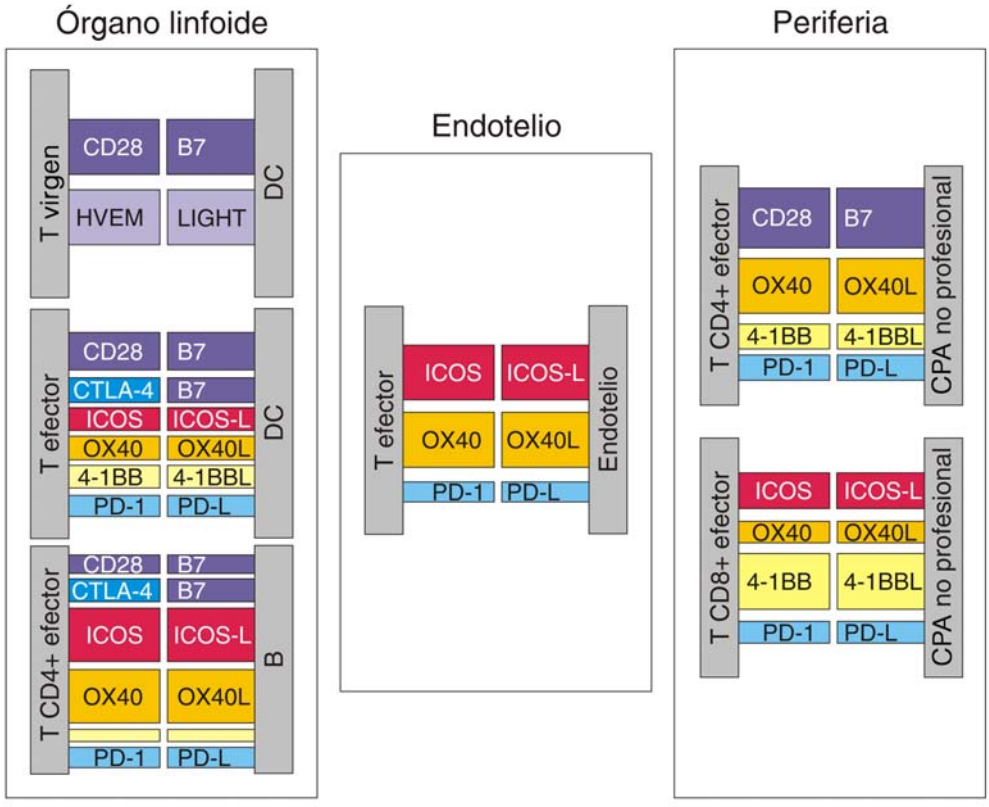


Figura 3.
Coestimulación periférica y central de linfocitos T.
Adaptado de ref. 7.

testino, etc.). La Figura 4 muestra cuáles moléculas se expresan en el linfocito T de acuerdo a la etapa o paso de la cascada de adhesión, al estado de activación del linfocito T y a su localización.

Para fines didácticos se divide la cascada de adhesión en cuatro etapas consecutivas (Figura 4), a saber:

a. Marginación y rodamiento
b. Activación
c. Adherencia propiamente dicha
d. Trasmigración o extravasación.

Inicialmente debe darse una disminución significativa en la velocidad del flujo sanguíneo, lo cual permite que las células viajen más lentamente a través del vaso sanguíneo y pueda ocurrir el fenómeno de marginación celular. En este momento se observa la expresión principalmente de selectinas (L-selectina en células en reposo y E-selectina en células efectoras y de memoria) y de integrinas de la familia α4 (especialmente la α4β7). Posteriormente se da el segundo paso, o de activación, cuando la célula T está en contacto con el endotelio, el cual involucra la expresión de la CCR7 en células en reposo y de las CCR4, CCR10 y CCR9 en células efectoras y de memoria. El tercer paso de la cascada es el proceso de adherencia propiamente dicho, en el cual el linfocito T queda firmemente adherido al endotelio. En este paso tienen participación de la LFA-1 (CD11a/CD18, αLβ2) y de α4β7. Finalmente, se da el cuarto paso de trasmigración, o extravasación al tejido (11). Adicionalmente, también se ha reportado que las células T CD4+Th1 y Th2 pueden presentar un repertorio diferente de receptores de quimioquinas; así, las células Th1 expresan preferencialmente CXCR3 y CCR5 mientras que las Th2 expresan CCR3, CCR4 y CCR8 (11).

Mecanismo de señalización en linfocitos T

La Figura 5 esquematiza algunas de las principales moléculas participantes de la señalización intracelular del linfocito T. El Ag presentado por la CPA en el contexto del MHC es reconocido por el TCR αβ induciendo la fosforilación de las tirosinas presentes en los ITAMs de las cadena ζ y ε del CD3, con la participación de algunas tirosinaquinasas, como la *Lck*, *Fyn* y *ZAP-70*. Esta última, a su vez, fosforila la proteína adaptadora LAT y el SLP76. Dichas fosforilaciones organizan complejos multimoleculares que contienen la fosfolipasa C gamma 1 (PLCγ1) y el factor de intercambio de nucleotidos Vav1. La PLCγ1 activada genera inositol-3 fosfato (IP3), que induce la liberación de Ca^{++}, y el diacilglicerol (DAG) que estimulan las proteinaquinasas tipo C (PKCs), en especial la PKCθ. Posteriormente, se da el reclutamiento del complejo NEMO-IKK cuya activación requiere Carma 1, Bcl10 y MALT1. La activación de IKK quinasas permite la fosforilación de los inhibidores IκB, que al degradarse facilitan la liberación del NF-κB, que se transloca hasta el núcleo donde activa la expresión de varios genes involucrados en la respuesta inmune. Puede haber lugar a diferentes procesos, como proliferación celular, producción de citoquinas, citolisis, etc. (12,13).

Linfocitos T αβ

La mayoría de los linfocitos T expresan el receptor tipo αβ y derivan principalmente de precursores intratímicos. Son las principales células efectoras y reguladoras de la respuesta inmune celular específica de antígeno, la cual se presenta en tejidos linfoides y no linfoides. Las características más relevantes de las células T αβ se encuentran descritas en la Tabla 1. Estas células se clasifican, de

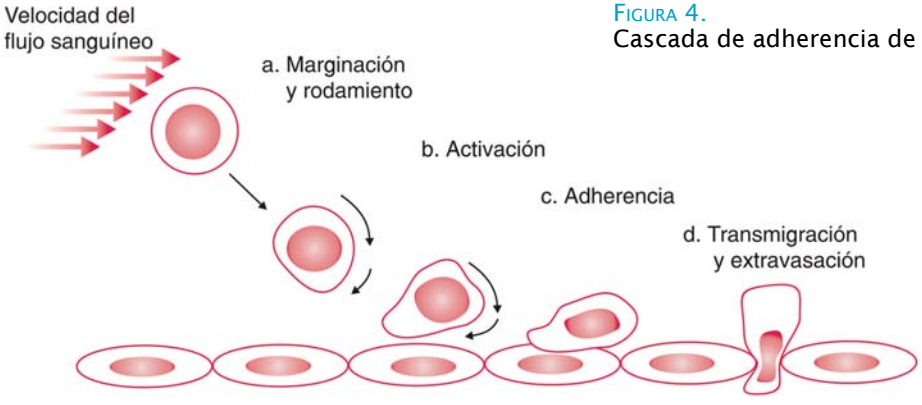


FIGURA 4.
Cascada de adherencia de linfocitos T.

Tipo de célula	Localización	a.	b.	c.	d.
En reposo	Nódulo linfático periférico	L-Selectina - PNAd	CCR7 – CCL21	LFA-1-ICAM1/2	¿?
	Placas de Peyer	L-Selectina-MadCAM-1	CCR7 – CCL21	LFA-1-ICAM1/2	¿?
	Nódulo linfático mesentérico	α4β7- MadCAM-1		α4β7- MadCAM-1	¿?
Efectora / Memoria	Piel	CLA – E- Selectina E-Selectina-Lig – E selectina	CCR4 – CCL17 CCR10 – CCL27	α4β7- VCAM-1 LFA-1-ICAM1/2	¿?
	Intestino	α4β7- MadCAM-1	CCR9- CCL25	α4β7- MadCAM-1	¿?

Adaptado de ref. 11.

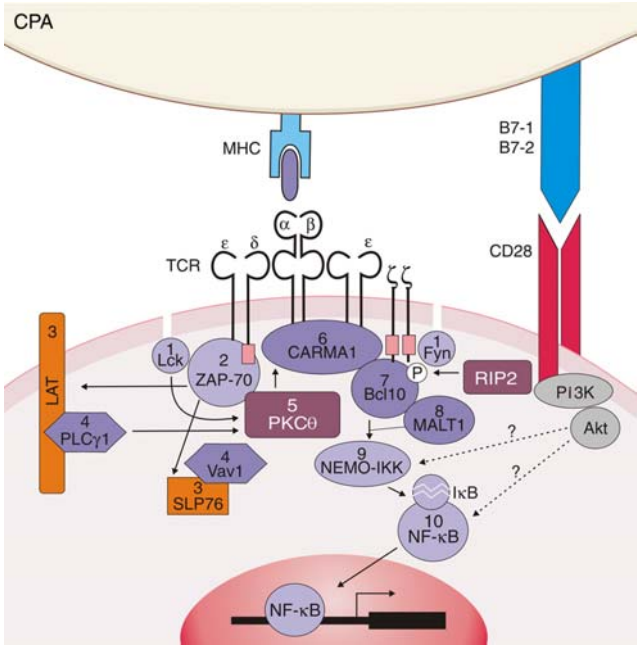


FIGURA 5.
Vías de señalización de Linfocito T.
Adaptado de ref. 13

acuerdo a la presencia de un correceptor, en células T CD4+ o CD8+; las primeras son consideradas como reguladoras primarias de la respuesta inmune y, bajo el estímulo del respectivo antígeno, producen una gran variedad de moléculas bioactivas denominadas linfoquinas (por provenir de linfocitos) entre las cuales están la interleuquina-2 (IL-2) que promueve de forma autocrina la proliferación de células T, el interferón gamma (IFN-γ) que activa y aumenta la capacidad microbicida de monocitos y macrófagos. Las células T CD4+ también interactúan directamente con los linfocitos B promoviendo su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos (plasmocitos). Estas células T CD4+ también son conocidas como T helper (Th) y, como se mencionó, según su patrón de síntesis de citoquinas se clasifican en Th1 (IL-12, IL-18, IFN-γ), Th2 (IL-4, IL10, IL-5) y Th3 (TGF-β).

Las células T CD8+ cuando son estimuladas se convierten en células T citotóxicas encargadas de la destrucción de células infectadas y tumorales. Expresan una variedad de proteínas citotóxicas tales como perforina, granzima y granulisina; adicionalmente, presentan una serie de proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis (CD178), el cual involucra la participación de las caspasas con la resultante disfunción mitocondrial y cesación de la respiración oxidativa, lo que ocasiona la muerte de la célula blanco (14). Los mecanismos involucrados en el proceso citolítico con perforina y granzimas son aun motivo de controversia; no obstante se sugieren tres vías, a saber:

1. Formación de un poro por parte de la perforina y el paso de la granzima a través de dicho poro hasta la célula blanco.
2. Receptor para granzima que permite la endocitosis granzima/perforina por parte de la célula blanco.
3. Proceso de entrada autónomo de la granzima sin involucrar el poro de la perforina. Independiente de cual sea el mecanismo de entrada de la granzima a las células blanco, una vez dentro, esta molécula activa la caspasa 8, la cual a su vez activa caspasa 3, considerada el principal mediador de muerte para mecanismos dependientes de caspasas (14).

Linfocitos T γδ

Las células T γδ son derivadas de precursores tanto intra como extratímicos. Como su nombre lo indica presentan un receptor T constituido por una cadena γ y una δ; constituyen menos del 15% de las células T circulantes y parecen tener un papel de "centinelas" que median la inmunidad local en tejidos de mucosas y ricos en epitelios (piel, intestino, tracto reproductivo, tracto respiratorio), donde su frecuencia es mayor (25-60%) y donde son conocidos como linfocitos γδ intraepiteliales. Su activación es multifactorial, pues además del estímulo del TCR, al reconocer el Ag específico, las células T γδ son activadas por otro tipo de interacciones receptor-ligando (15). En la Tabla 1 se resumen las características más relevantes de los linfocitos T.

Los linfocitos T γδ tienen una serie de funciones tales como destrucción citolítica de células trasformadas o estresadas, control de la inflamación y de la respuesta inmune, y la modulación del crecimiento de las células epiteliales (16). Se les considera células de primera línea de defensa y reguladoras de la respuesta inmune. En la Figura 6 se resumen varios aspectos de la biología de los linfocitos T γδ intraepiteliales.

Linfocitos B

Las características más importantes de estos linfocitos se encuentran descritas en la Tabla 1. Los linfocitos B maduros pueden ser divididos en varias subpoblaciones en función de su localización, fenotipo en superficie celular, especificidad de antígeno y vías de activación. Hay tres tipos de linfocitos B maduros (6,17):

1. Células B foliculares (FoB) o B-2. Son generadas directamente en la médula ósea y llegan hasta los folículos de órganos linfoides secundarios y la circulación; se consideran células B en reposo y es la subpoblación de linfocitos B más grande. Su diferenciación está influenciada por una gran variedad de factores que incluyen quimioquinas, señalización del BCR y algunos antígenos. Participan de respuestas inmunes T-dependientes pues pueden usar el BCR para engolfar el antígeno, procesarlo y presentárselo a las células T Ag específicas.
2. Células B de la zona marginal (MZB). Están localizadas en las zonas marginales del bazo. Contribuyen de una manera significativa a respuestas T independientes tipo 2, responden rápidamente al estímulo específico con Ag y se trasforman a células plasmáticas que

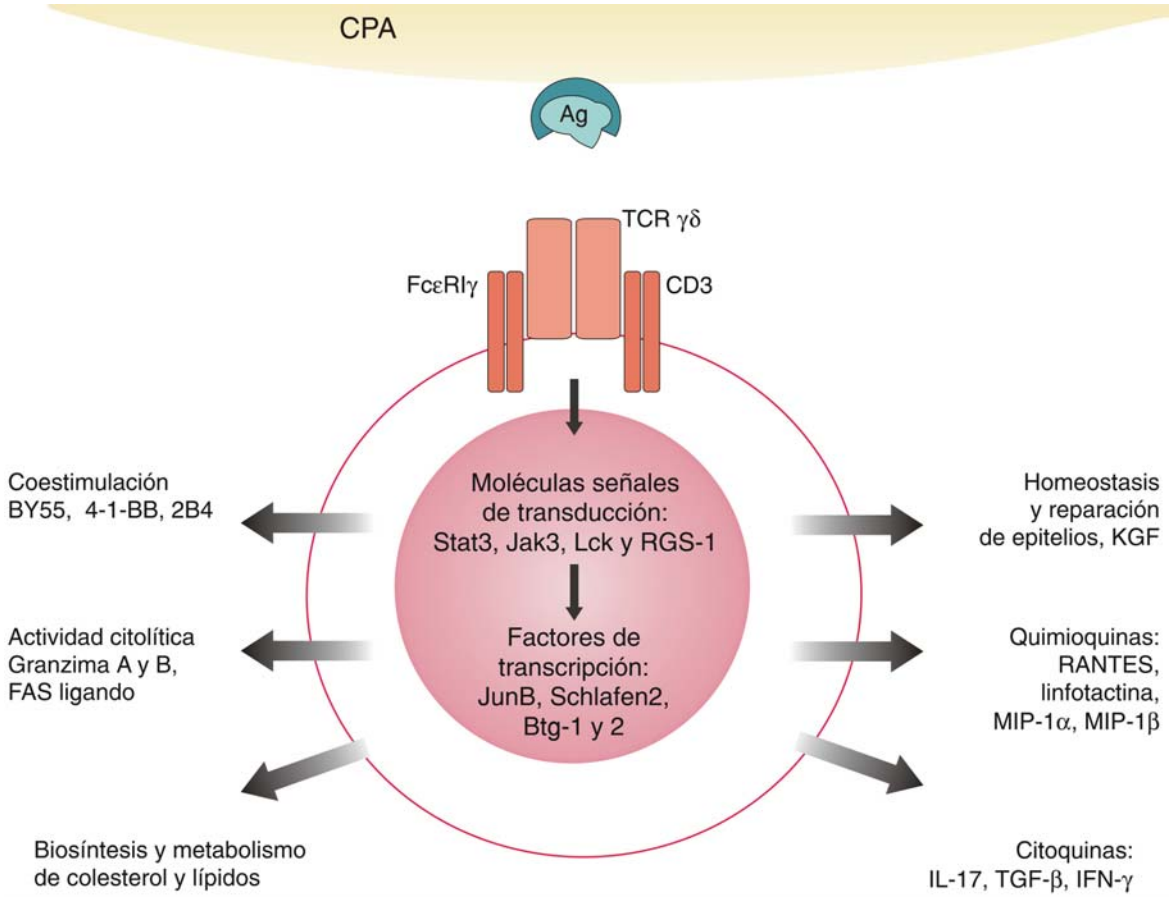

CPA
Ag
TCR γδ
FcεRIγ
CD3
Moléculas señales de transducción: Stat3, Jak3, Lck y RGS-1
Factores de transcripción: JunB, Schlafen2, Btg-1 y 2
Coestimulación BY55, 4-1-BB, 2B4
Actividad citolítica Granzima A y B, FAS ligando
Biosíntesis y metabolismo de colesterol y lípidos
Homeostasis y reparación de epitelios, KGF
Quimioquinas: RANTES, linfotactina, MIP-1α, MIP-1β
Citoquinas: IL-17, TGF-β, IFN-γ

FIGURA 6.
Aspectos biológicos de los linfocitos T γδ intraepiteliales.
Adaptado de ref. 16.

TABLA 4. Características de las subpoblaciones de Linfocitos B: B1, MZ y Fo.

Característica	B1	MZ	Fo
Tiempo de vida media	Prolongado	Prolongado	Prolongado
Recirculación en linfa	—	—	+
Respuesta T independiente	+++	+++	+
Respuesta T dependiente	+/— ¿?	+	+
Isotipo favorito	IgM, IgG3, IgA	IgM, IgG3	IgG1
Presentación de Ag *in vitro*	+++	+++	+
Tiempo del ciclo celular	Corto	Corto	Prolongado
Proliferación a:			
LPS	+++	+++	+
anti CD40	++	++	+
anti IgM	—	—	+
anti IgM + anti-CD40	++	++	++
Selección dependiente del correceptor / IgM	++	++	+/—
Expresión de CD9	+	+	—
Apoptosis inducida por anti-IgM	—	+++	+
Dependencia de *pyk-2*	—	+	—
Expresión de marcadores de B1 (CD5, IL-5R, CD43)	+	—	—
Resistencia a la apoptosis mediada por Fas	+	—	—

Adaptado de ref. 18.

secretan IgM de baja afinidad. Su papel en enfermedades autoinmunes es motivo de investigación, por ejemplo el compartimiento de células MZB está expandido en ratones F_1 NZB/NZW con lupus y es asociado con nefritis; así mismo, se ha reportado que esta subpoblación está aumentada en varios modelos murinos de autoinmunidad obtenidos por ingeniería genética.

3. Células B-1. Son las primeras células B en formarse en el hígado fetal. Se subdividen en B1a y B1b, las primeras expresan la glicoproteína de membrana CD5 la cual está ausente en las segundas. Ambas expresan los marcadores CD9 y CD45RA, están involucradas en respuesta inmune de tipo T-independiente, se encuentran en cavidad peritoneal y pleural y son la principal fuente de anticuerpos que se encuentran en circulación. Al igual que las MZB, las B-1 responden rápidamente al estímulo específico con Ag y se trasforman a células plasmáticas. Su número se ha visto aumentado en estudios experimentales y en humanos con enfermedades autoinmunes. Su eliminación en modelos murinos ha mostrado inducir disminución en los títulos de autoanticuerpos.

En la Tabla 4 se resumen las características diferenciales de estas tres subpoblaciones de linfocitos B maduros que permiten distinguirlas tanto a nivel fenotípico como funcional (18).

Receptor B (BCR)

El receptor BCR es un complejo macromolecular conformado por la IgM / IgD de membrana con dos moléculas accesorias adicionales denominadas Igα (CD79a) e Igβ (CD79b). Las inmunoglobulinas de membrana (mIg) son glicoproteínas con una unidad estructural básica conocida como monómero. Cada monómero está formado por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas son pesadas o H (heavy), con un peso molecular aproximado de 65 kDa, y las otras dos cadenas son livianas o L (light), con un peso molecular de 25 kDa. Cada cadena L está unida a una cadena H por un puente disulfuro. Las cadenas H están unidas entre si por al menos otro puente disulfuro. Esta estructura de los monómeros de IgM o IgD corresponde al segmento extracelular del BCR. Sin embargo, las mIg también tienen otros dos segmentos: transmembranal e intracitoplasmático, que resultan de una extensión de la porción carboxi-terminal de las dos cadenas H. En las porciones amino-terminal de cada cadena peptídica, H y L, del BCR se encuentran los dos dominios V que forman los sitios activos mediante los cuales cada receptor del linfocito B se puede unir específicamente a un determinante antigénico. La unión antígeno-BCR es una reacción no-covalente.

Cada dominio de las mIg que forman los BCR tiene una conformación globular. Esta estructura tridimensional resulta del plegamiento de la cadena, la cual forma varias hebras β plegadas antiparalelas que se ubican en dos planos y le dan rigidez a la conformación globular que va a tener cada dominio. En cada dominio, las hebras rígidas β plegadas se continúan con segmentos flexibles, constituidos por aminoácidos diferentes, que forma un bucle o rizo. A su vez, cada bucle se continúa con otra hebra β plegada dispuesta en sentido antiparalelo a la anterior. En la porción más externa de los bucles de los dominios V de las dos cadenas, H y L, se localizan las secuencias hipervariables de aminoácidos hidrofóbicos que forman el sitio activo del BCR.

La extraordinaria variabilidad para combinarse que tienen los sitios activos de los receptores de los linfocitos B depende del reordenamiento al azar de un conjunto de genes que están repartidos en varios segmentos del DNA. Cada gen codifica las secuencias de aminoácidos de una de las regiones hipervariables de los dominios V de las cadenas L y H. La variabilidad del sitio activo de los BCR está controlada genéticamente en la misma forma que la variabilidad de los sitios activos de las inmunoglobulinas solubles.

La región intracitoplasmática de las mIg es muy pequeña y presenta solo 3 aminoácidos (lisina-valina-lisina) que no le permite *per se* realizar el proceso de señalización. El segmento transmembranal de la porción C-terminal de las cadenas H de las mIg consta de 25 aminoácidos, se encuentra cercano a las enzimas tirosina quinasas (PTK) que están cercanas a los heterodímeros (Igα e Igβ) que son los encargados del proceso de señalización, ya que pueden proporcionar el sustrato de las tirosinas en sus regiones ITAM. Las principales PTK que se encuentran en la membrana de los linfocitos B son miembros de la familia *Src* y se conocen como las quinasas *Fyn, Blk, Lck* y *Syk*. Cada vez que ocurre el reconocimiento de un antígeno por los BCR, se inicia una cascada de reacciones enzimáticas que fosforilan los resíduos tirosina en las colas citoplásmicas de las dos cadenas de los heterodímeros. Estas reacciones se encargan de la transducción de la señal desde la membrana hasta el núcleo, lo que induce en el linfocito B una serie de eventos metabólicos que lo transforman en una célula plasmática. Una vez convertidos en células plasmáticas, éstas inician la producción de grandes cantidades de anticuerpos solubles, los cuales están dirigidos, específicamente, contra el mismo determinante que inicialmente se unió al BCR.

Existen, además, otra serie de moléculas que conforman un complejo molecular que actúa como coreceptor BCR. Estas moléculas pueden aumentar de manera significativa la señalización dada inicialmente por el BCR e incluyen CR2, CD19, CD21, CD45, CD38 y CD81 (17).

Moléculas coestimuladoras de linfocitos B

Un aspecto importante en la activación de las células B es la presencia de una serie de moléculas que la regulan de manera positiva o negativa; en conjunto se les llama moléculas coestimuladoras, a continuación se describen algunas de ellas.

El factor activador de células B (BAFF), es una proteína miembro de la familia del TNF. Es esencial en la

maduración y sobrevida de las células B, pues participa en los procesos de diferenciación y proliferación. Hasta la fecha se han identificado tres receptores para BAFF, siendo la interacción con el BAFF-R el más crítico para permitir la maduración y actuar en combinación con el BCR. Algunos modelos murinos transgénicos para BAFF muestran incremento significativo en el número de células B, producción de autoanticuerpos y desarrollan patologías similares al lupus eritemasos sistémico (LES) y síndrome de Sjögren (SS). En el suero suero de pacientes con LES, SS y artritis reumatoide se ha observado niveles elevados de BAFF (17).

El CD40, molécula de 45-50 KDa perteneciente a la familia de receptores tipo TNF, se expresa en todos los estadios de la células B, y con su ligando CD40L (CD 154), presente en el linfocito T, forman otro grupo de moléculas importantes en la regulación de la activación de las células B, permitiendo procesos de señalización a través de la activación de varias proteína tirosina quinasas (PTK) tales como ERK-1, ERK-2, p38 y JNK lo cual permite a su vez la activación de varios factores de trascripción como NF-kB, AP-1 y NF-AT. Estos procesos causan la síntesis de otras varias moléculas bioactivas que llevan a efectos finales como son la maduración, diferenciación y proliferación celular de los linfocitos B con la subsecuente producción de anticuerpos y finalmente la producción de células de memoria (19).

Adicionalmente, y como se enuncia en la Tabla 3, el linfocito B expresa otra serie de moléculas de las superfamilias CD28/B7 y TNF/TNFR que interactúan directamente con el linfocito T como moléculas coestimuladoras, entre ellas están B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD70, ligando de ICOS (ICOS-L), ligando de CD30 (CD30-L o CD153), ligando de 4-1BB (4-1BBL), SLAM (CD150), entre otros (7).

Moléculas de adhesión en linfocitos B

En los mecanismos de adhesión para la movilización de los linfocitos B participan varios tipos de moléculas como son las quimioquinas y sus receptores, las selectinas y las integrinas. Existe un grupo de quimioquinas/receptores que se expresan constitutivamente en las células del tejido linfoide y ayudan a la recirculación de los linfocitos, conocidas como quimioquinas linfoides, las cuales incluyen CXCL12/SDF1, CXCL13/BLC, CCL19/ELC, y CCL21 (SLC) entre otras (20,21) (Tabla 5).

Las células secretoras de anticuerpos expresan altos niveles de integrinas como la $\alpha 4\beta 1$ y LFA-1, expresan además ICAM-1, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$; las células plasmáticas del intestino y de la glándula mamaria expresan $\alpha 4\beta 7$ (20,21).

Las selectinas son otra familia de moléculas que contribuyen a la adhesión y movilización de las células B. Los plasmocitos tienen una alta expresión de PSGL-1 (glicoproteína ligando de la P selectina) que reconoce la P y la E selectina (20). Otra molécula que participa en los procesos de residenciamiento (homing) de las células B es la CD22, miembro de la familia de Siglec (sialic acid binding immunoglobulin-like lectin) que une preferencialmente azúcares con radicales $\alpha 2,6$-ac. siálico y está presente principalmente en células B maduras (20).

Mecanismo de señalización en los Linfocitos B

La estimulación de las células B vía receptor antigénico B (BCR) induce la activación de los motivos ITAM presentes en las cadenas Igα e Igβ accesorias, las cuales hacen la misma función de la cadena ζ del CD3 para el activar al TCR (Figura 7). Posteriormente se da la activación de varias proteína quinasas, esencialmente *Lyn*, *Fyn* y *Blk*. La traslocación de *Blk* a la membrana es dependiente de la activación de la PI3K la cual requiere BCAP.

Tabla 5. Moléculas de adhesión en linfocitos B.

Receptor	Quimioquina	Distribución de quimioquina	Células
CCR7	CCL19 (ELC)	Zona T, Células dendrítica	Células B y T, células dendríticas
	CCL21 (SLC)	Zona T, Linfáticos, HEV	Células B y T células dendríticas
CCR9	CCL25 (TECK)	Intestino delgado,timo	Células secretoras de IgA, timocitos, Células T memoria
CCR10	CCL27 (CTACK)	Piel	Células secretoras de IgA,
	CCL28 (MEC)	Estómago, colon, glándula salival y mamaria	Células secretoras de IgA
CXCR3	CXCL9 (MIG)	Sitio de inflamación Tejido linfoide	Células secretora de Acs, Células NK, células T efectoras
	CXCL10 (IP10)	Sitio de inflamación Tejido linfoide	Células secretora de Acs, Células NK, células T efectoras
	CXCL11 (ITAC)	Sitio de inflamación Tejido linfoide	Células secretora de Acs, Células NK, células T efectoras
CXCR4	CXCL12 (SDF1)	Médula ósea, pulpa roja, epitelio, otros	Células Pro-B, células secretora de Acs, Células dendríticas, células T
CXCR5	CXCL13 (BLC, BCA 1)	Folículos linfoides Cavidades corporales	Células B maduras, células B B1, Células T helper

Adaptado de ref. 20.

Dicha traslocación pone a *Blk* cerca de *Syk* haciendo que se fosforile. Entonces *Btk*, *BLNK* y *Syk* cooperan para activar la fosfolipasa C gamma –2 (PLCγ2) e inducir la producción de inositol trifosfato (IP3) y el flujo de Ca++. Éstos actúan como segundos mensajeros y activan PKCβ, que en combinación con el trío molecular de Carma-1, Bcl10 y MALT1 activan el complejo NEMO-IKK induciendo la degradación de IkB y la consecuente liberación el factor de trascripción NF-κB que se trasloca hasta el núcleo y permite la expresión de determinados genes que le hacen que la célula ejerza sus funciones (13).

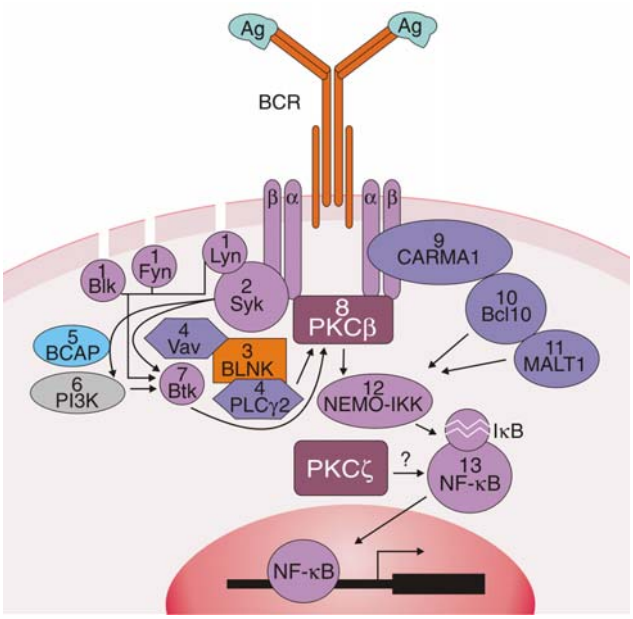


FIGURA 7.
Vías de señalización de linfocito B.
Adaptado de ref. 13.

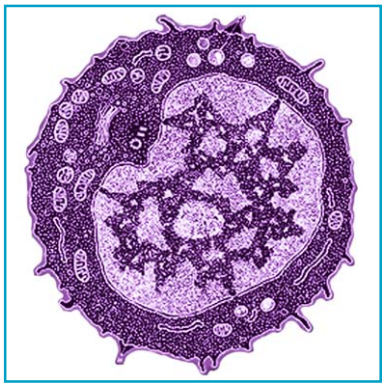
Referencias

1. Robey EA, Bluestone JA. Notch signaling in lymphocyte development and function. Curr Opin Immunol 2004;16:360-6
2. Radtke F, Wilson A, MacDonald HR. Notch signaling in T- and B-cell development. Curr Opin Immunol 2004;16:174-79
3. Davis MM, Chien YH. T Cell antigen receptor genes. In: Hames B.D. and Glover D.M. editor. Molecular Immunology, New York, Oxford University Press, 1996:101-31
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, Saunders Company, Philadelphia, 4 Ed. 2003;125 –160
5. Zamoyska R, Lovatt M. Signalling in T-lymphocyte development: integration of signaling pathways is the key. Curr Opin Immuno 2004; 16:191-6
6. Wang H, Clarke SH. Regulation of B-cell development by antibody specificity. Curr Opin Immunol 2004;16:246-50
7. Kroczek RA, Mages HW, Hutloff A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. Curr Opin Immunol 2004;16:321-7
8. Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell - B-cell interactions. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:175-91
9. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS. Eur J Immunol 2000;30:3707-17
10. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, et al. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. J Exp Med 1999;190:1115-22
11. Iparraguirre A, Weninger W. Visualizing T Cell migration *in vivo*. Int Arch Allergy Immunol 2003;132:277-93
12. Terhorst C, Spits H, Staal F, et al. T lymphocyte signal transduction. In: Hames BD, Glover DM. editor. Molecular Immunology, New York, Oxford University Press, 1996:132-88
13. Weil R, Israel A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kB in lymphocytes. Curr Opin Immunol 2004;16:374-81
14. Vallejo AN, Davila E, Weyand CM, et al. Biology of T lymphocytes. Rheumatic Dis Clin N Am 2004,30:135-57
15. Carding SR, Egan PJ. γδ T Cells: Functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol 2002,2:336-45
16. Boismenu R, Havran WL. Intraepithelial γδ T Cells exposed by functional genomics. Genome Biology 2001;2: 1031.1-1031.4
17. Weinstein E, Peeva E, Putterman Ch, et al. B-cell biology. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:159-74
18. Martin F, Kearney J. B1 Cells: Similarities and differences with other B cell subsets. Curr Opin Immunol 2001;13:195-201
19. Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. Gut 2004;53:1035-43
20. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells. Immunol Review 2003; 194:48-60
21. Severinson E, Westerberg L. Regulation of adhesion and motility in B lymphocytes. Scand J Immunol 2003; 58:139-144

8

LINFOCITOS B, EN LA PRIMERA LÍNEA DE AUTOINMUNIDAD

Pierre Youinou
Christophe Jamin
Sophie Hillion
Sandrine Jousse
Alain Saraux
Jacques-Olivier Pers



El paradigma de que la respuesta linfocitaria B contra los autoantígenos sea inicialmente inducida por anticuerpos (Ac), no ha sido resuelto. Estudios en la última década han demostrado que los linfocitos B tienen otras funciones distintas a la producción de anticuerpos, y que éstas podrían contribuir al desarrollo de la autoinmunidad. Estas células intervienen en el desarrollo, regulación y activación de los órganos linfoides, regulan la función de las células dendríticas y las distintas subclases de células T a través de la producción de citoquinas. La generación de los receptores de los linfocitos B es esencial tanto para el funcionamiento de estas células, como para prevenir el desarrollo de autoinmunidad. Las anormalidades en la distribución de las subclases de las células B en las enfermedades autoinmunes y el beneficio clínico observado por la depleción de células B en estas patologías ilustran su importancia. Los modelos transgénicos han demostrado que la sensibilidad de los linfocitos B a la unión cruzada con el receptor del antígeno se correlaciona con el desarrollo de autoinmunidad; así, la señalización negativa por medio de CD5 y CD22 con el fin de mantener la tolerancia a través del reclutamiento de la proteína tirosin-fosfatasa 1, que contiene el dominio de homología scr-2, ha sido documentada. En la actualidad los linfocitos B recobran importancia en la etiopatogenicidad de las enfermedades autoinmunes.

Contenido

Subpoblaciones de linfocitos B
Funciones de los linfocitos B
La tolerancia del linfocito B y su alteración
- El receptor del linfocito B (BCR)
- Mecanismos de auto-tolerancia
- La respuesta del receptor antigénico

Introducción

Las enfermedades autoinmunes se dividen en dos tipos: enfermedades *órgano-específicas* tal como la tiroiditis de Hashimoto, la diabetes autoinmune, la anemia hemolítica y la miastenia gravis (MG); y en *no-órgano-específicas* como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), la Artritis Reumatoide (AR), el Síndrome de Sjögren primario (SSp) o la Esclerosis Sistémica (SSc). Los antígenos (Ag) locales son importantes en el desarrollo de las enfermedades *órgano-específicas*, mientras que en las *no-órgano-específicas* intervienen las anormalidades celulares y humorales. Basándose en el predominio de los linfocitos T en los riñones de pacientes con LES (1), en la sinovia de aquéllos con AR (2) y en las glándulas exocrinas de los pacientes con SSp (3), los linfocitos T han sido señalados como células claves en el estudio de la autoinmunidad; hasta tal punto que, las enfermedades sistémicas autoinmunes se han descrito como secundarias a los linfocitos T defectuosos (4). Por el contrario, la descripción de la función de los linfocitos B se ha limitado a la producción de anticuerpos (Ac) y no se les ha asignado papel protagónico en la autoinmunidad. Sin embargo, una gran serie de auto-Ac han sido descritos (5,6) y algunos de ellos podrían ser los causales directos del daño orgánico en el modelo murino propenso al lupus (7) y en pacientes humanos (8); es más, los auto-Ac pueden incluso servir como marcadores de predicción (9). La teoría que por años se ha difundido es que la persistencia de los linfocitos B autorreactivos es secundaria a la falla del mantenimiento de la tolerancia por los linfocitos T y que las citoquinas existentes en el medio permiten la proliferación de estos linfocitos B.

En años recientes, sin embargo, se han logrado importantes avances en el conocimiento de los linfocitos B autorreactivos (10). Diversos investigadores han tratado de explicar las anormalidades humorales observadas sobretodo en LES, tanto en humanos (11) como en ratones (12). Nuevos trabajos involucran a los linfocitos B en la fase aferente de la respuesta inmune, y no solamente en la fase eferente de ésta. Por ejemplo, Klinman y Steinberg (13) proponen que las enfermedades sistémicas autoinmunes son el resultado de la activación policlonal de los linfocitos B. Alteraciones en la regulación normal de los Ac (14) se han observado en familiares de pacientes con LES (15), AR (16) o SSp (17), por lo que se propone que los familiares de estos pacientes podrían desarrollar algún tipo de enfermedad autoinmune. Lo anterior se soporta en el hallazgo de un aumento en la producción de IgG sérica, en respuesta a mitógenos y por ende a Ag y auto-Ag.

El antiguo concepto que las células B están destinadas a la producción de inmunoglobulinas (Ig) - auto-Ac, ha sido reconsiderado y se le reconocen otras funciones. Algunos linfocitos B pueden ser defectuosos y podrían participar en el proceso autoinmune, así, la tolerancia de los linfocitos B y el rompimiento de ésta, son conceptos que deben ser reevaluados a la luz de la evidencia actual. La supervivencia y selección de linfocitos B está determinada por la especificidad del receptor antigénico de células B (BCR), pero la transducción de señales es mediada por una gran cantidad de coreceptores, por numerosas proteínas tirosin quinasas (PTK) y proteínas tirosin fosfatasas (PTP), entre otras.

Estudios para el tratamiento de las enfermedades sistémicas autoinmunes dirigidos contra distintas subclases de linfocitos B y/o contra auto-Ac (18,19), son llevados a cabo por el mayor conocimiento del papel de éstas células en estos trastornos, y a los resultados positivos obtenidos en estudios con ratones. Además, estos tratamientos no sólo depletan los auto-Ac eficientemente, sino que la mejoría clínica también es marcada. De la misma manera, estos estudios a su vez, ayudan al entendimiento de cómo el proceso autoinmune es disparado y mantenido.

Subpoblaciones de linfocitos B

Clasificación acorde a la expresión de CD5

El CD5 fue en un principio descrito como un marcador de los linfocitos T, después fue identificado en células B malignas (20) y por último en un subtipo benigno de linfocitos B ubicado en las amígdalas humanas (21) y en sangre periférica (22). Un aumento en el número de linfocitos B CD5+ se ha observado en pacientes con AR y SSp (23-26). La expresión del CD5 en los linfocitos B se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad en pacientes con hepatitis crónica (27), enfermedad de Graves (28), miastenia gravis (29), síndrome antifosfolipídico primario (30), nefropatía por IgA (31), AR juvenil (32) y esclerosis múltiple (33). Los pacientes con SSp e hipergammaglobulinemia monoclonal presentan mayores niveles de linfocitos B CD5+ que los pacientes sin éste hallazgo, lo que se podría correlacionar con la mayor frecuencia de linfoma en estos pacientes (34). Los linfocitos B CD5+ se caracterizan por la producción de auto-Ac polirreactivos, de baja afinidad (35), y por la tendencia a la transformación maligna (36), que da lugar a linfomas, principalmente a la leucemia linfocítica crónica. Además, las células leucémicas pueden inducirse a la producción de auto-Ac con el uso del éster de forbol (37). De manera intrigante, la proporción de linfocitos B CD5+ es por lo común constante en un individuo dado (38), y los niveles elevados de estas células son una característica de las familias de algunos pacientes con AR más que una característica aislada de los pacientes con AR si se comparan sus niveles con los de sus familiares sanos (16).

Aún existen controversias sobre el linaje de estas células, pero grandes esfuerzos se han realizado para tratar de entender el significado de los linfocitos B CD5+ en pacientes sanos y enfermos (39). Desde el punto de vista de activación, se propone que los linfocitos B CD5+ son generados a partir de linfocitos B CD5- (40); mientras que, desde el paradigma del linaje se postula la existencia de progenitores separados para los linfocitos B CD5+ y CD5- (41). Una nueva nomenclatura para los linfocitos B ha sido propuesta (42) y distingue 2 tipos de linfocitos B1 y B2 (Figura 1). Los primeros comprenden los linfocitos B

CD5+ y los linfocitos B2 incluyen los linfocitos B convencionales. Es incierto si los linfocitos B1 constituyen una población de células vírgenes. Se ha mencionado que pueden existir diferentes motivos por los cuales los linfocitos B expresan el CD5, especialmente como consecuencia de la unión de coreceptores a su superficie (43). En este aspecto, la población de los linfocitos B1 se ha subdividido en B1a y B1b (44). La "población hermana" B1b carece del marcador CD5, pero comparte todas las otras características de las células B1a, tales como la producción natural de Ac, la expresión del marcador mielomonocítico CD11b/CD18 y la baja densidad de las isoformas de alto peso molecular del antígeno leucocitario común CD45. Además, por un mecanismo de retroalimentación (45), la distribución de los linfocitos B en subtipos de B1 y B2, en los subsubtipos B1a y B1b es regulada, al menos en modelos murinos, por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (46) y por los niveles de la IL-10 (47). Anaya et al (48) han mostrado que la influencia de la IL-10 en el proceso autoinmune del SSp está ligada a polimorfismos del gen de la IL-10. También se ha reportado que el Epstein-Barr virus (EBV) estimula a los linfocitos B CD5- a transcribir el RNA mensajero (mRNA) del marcador CD5, a niveles comparables a los encontrados en su contraparte CD5+ (49).

Ontogénesis de linfocitos B

Las células B se originan en el hígado durante la vida fetal y en la médula ósea (MO) después del nacimiento (50), lugares en los que los linfocitos B atraviesan por una serie de estados intermedios. La gran diversidad del repertorio de los BCR resulta del rearreglo ordenado (Figura 2) de

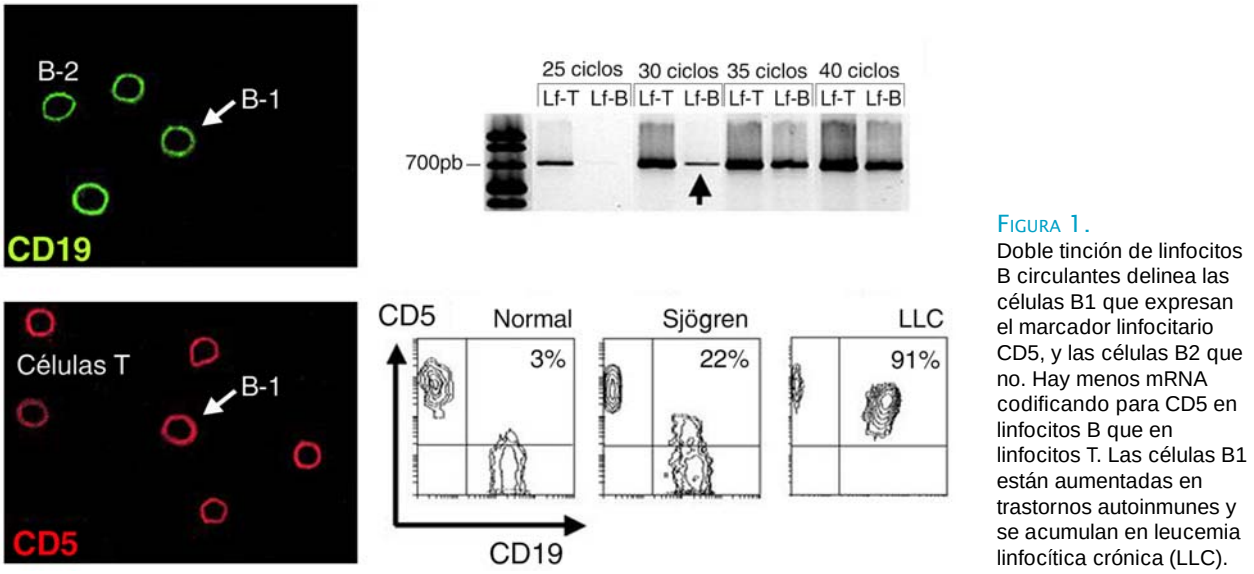


Figura 1.
Doble tinción de linfocitos B circulantes delinea las células B1 que expresan el marcador linfocitario CD5, y las células B2 que no. Hay menos mRNA codificando para CD5 en linfocitos B que en linfocitos T. Las células B1 están aumentadas en trastornos autoinmunes y se acumulan en leucemia linfocítica crónica (LLC).

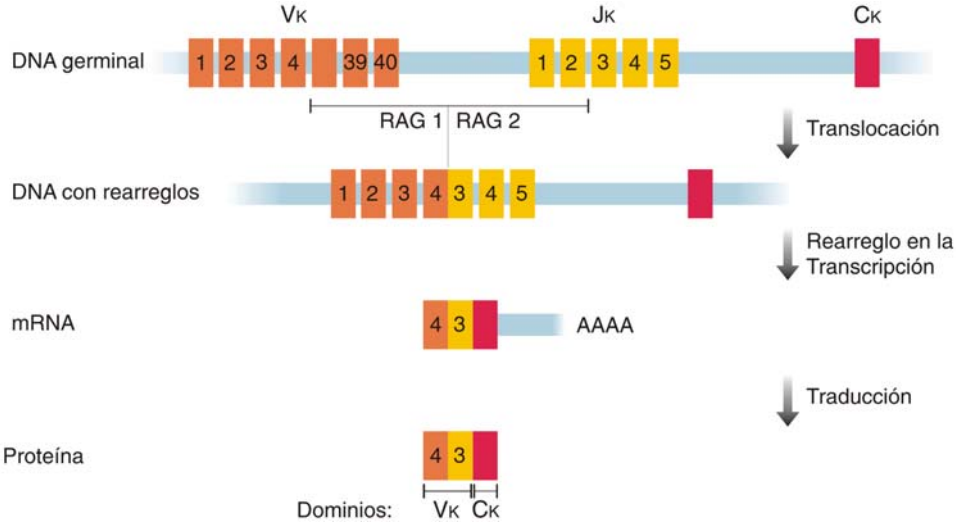


Figura 2.
Rearreglo genético ordenado de los segmentos V y de la cadena liviana J para producir la parte variable de una cadena liviana. Las enzimas RAG (gen activador de la recombinación) están involucradas en este proceso.

los segmentos genéticos V, D y J de la cadena pesada y de los segmentos V y J del gen de la cadena liviana (51). Aproximadamente 2 x 10^7 linfocitos B son generados a diario en la MO (52). Las células pro B, una vez que los genes de las Ig hayan sido rearreglados pasan a ser células pre B.

Estas células conocidas como linfocitos B inmaduros, migran a la periferia. Este curso depende en las señales generadas por los Ag, pero es incierto si éstas se presentan en todos los linfocitos B inmaduros o sólo en algunos de estos; siguiendo la maduración mediada por el BCR estos linfocitos abandonan los tejidos linfoides primarios y llegan a los órganos linfoides secundarios (OLS). Sin embargo, no se ha observado una muerte masiva de linfocitos B en la MO y es posible que una gran cantidad de células inmaduras abandonen este órgano central y maduren como linfocitos B recirculantes (Figura 3).

Maduración de células B en los centros germinales

Aquellas células que han alcanzado los OLS (53) se convierten, al menos en modelos murinos, en linfocitos B transicionales tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (54), paso a paso hacia la competencia inmune. Sólo los linfocitos B maduros entran al folículo linfoide (FL) para producir los centros germinales (CG) y participar en la respuesta inmune (55). Las células B no circulantes son los linfocitos B de la zona marginal (ZM) (56) y las células B foliculares (57,58). De forma significativa, en los linfocitos de la ZM, los subgrupos se diferencian en células productoras de Ac tempranas, mientras otras dan lugar a CG con hipermutación y memoria en respuesta a Ag T dependientes (59). Además, los linfocitos B proliferan dentro de las glándulas exocrinas en ciertos modelos animales de SSp (60) y pueden dar lugar a linfomas en algunos pacientes con SSp (61). Por tanto, los linfocitos de la ZM pueden ser determinantes claves en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes. La entrada a los FL depende de quimioquinas específicas y las señales para permanecer allí son dadas por el BCR. La importancia del proceso en el FL se clarifica cuando se observa la presencia de CG ectópicos en sitios de inflamación en el SSp (62), la AR (63) y la tiroiditis de Hashimoto (64); aunque la activación del BCR por auto-Ag puede ocurrir en los distintos órganos blanco, por ejemplo la IgG en la sinovial reumatoidea (65), el DNA de doble cadena (DNAds) en la piel y riñones de los pacientes con LES (66), o partículas de Ro/SSA y La/SSB en tejidos exocrinos de pacientes con SSp (67). Es aún más importante que los auto-Ac pueden desarrollarse por fuera del CG, como ha sido demostrado en el modelo murino MRL *lpr/lpr* de LES (68). En algunos linfocitos B se desencadena apoptosis, mientras otros, gracias a los linfocitos T, son rescatados. La capacidad de los linfocitos T de promover la proliferación de los linfocitos B parece estar relacionada con la unión del CD40 ligando (CD154), con su receptor CD40 (69). Dado este contexto, es interesante que las reacciones anormales en CG de pacientes con LES han sido demostradas por interacciones CD154-CD40 (70).

El análisis de los linfocitos B en los CG dentro de los FL secundarios en la vecindad de la zona del manto (Figura 4), ha revelado un amplio número de marcadores de superficie (71). En particular IgD y CD38 han sido útiles para clasificar los estados de desarrollo, al menos en humanos, y con base en estos marcadores 7 subpoblaciones de linfocitos B maduros (Bm) se han podido establecer (Tabla 1). Bm1 virgen (IgD+ CD38-) que una vez activado como Bm2 (IgD+ CD38+) se diferencia en el CG a

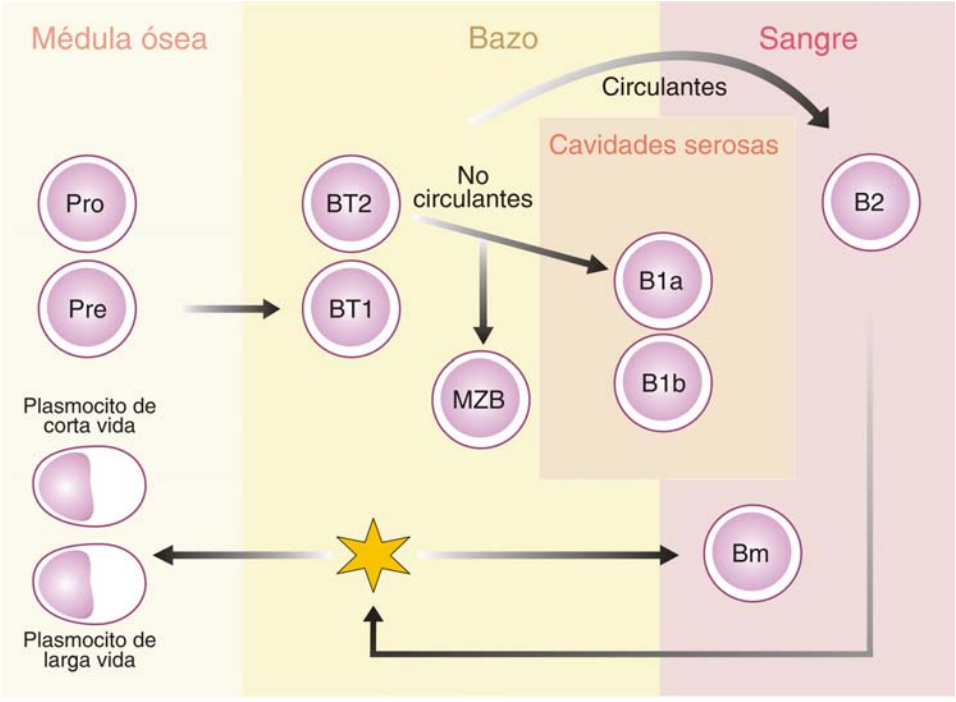


Figura 3.
Ontogénesis de linfocitos B en el modelo murino.
BT: linfocito B transicional, MZB: linfocito-B de zona marginal, Bm: linfocito B de memoria.

Bm2' (IgD+ CD38++), en centroblastos Bm3 y centrocitos Bm4 (IgD- CD38++) y termina como Bm5 temprano (IgD- CD38+) y Bm5 (IgD- CD38-), como por ejemplo los linfocitos B de memoria que expresan CD27 y células plasmáticas (CP) que no lo expresan. De este modo, parecen existir 2 tipos de linfocitos B de memoria de larga vida, uno quiescente en lugares microanatómicos especializados de los OLS tal como en la zona del manto en el bazo, y el otro tipo activado en la MO. Esta reserva de CP de larga duración podría ser importante en la inmunidad natural (72). A lo largo de la evolución de Bm1 a Bm5, cierto número de células de cada subtipo salen a la sangre periférica. La distribución de estas células está sesgada en pacientes con autoinmunidad: patrones característicos de los subtipos de linfocitos B han sido recién identificados. La tinción de los linfocitos B de sangre periférica de los pacientes con SSp, mostró grandes similitudes con células del CG (73, Arbonneau, Devauchelle, Pers, Saraux, Pennec y Youinou, manuscrito en preparación) y los de pacientes con LES juvenil tienen características de células de CG pregerminales y de precursores de CP (73). Por otro lado, el número de linfocitos B de memoria está disminuido en pacientes con SSp (74, 75), pero se propone que la acumulación preferencial de los linfocitos B de memoria CD27+ en las glándulas parótidas inflamadas de estos pacientes (76) sea la causa de su reducción en la sangre periférica. Por el contrario, el LES activo se caracteriza por un aumento en CP circulantes que son normalizadas por la terapia inmunosupresora (77); y a diferencia de lo descrito en pacientes con SSp y LES, en AR ninguna diferencia significativa en las subpoblaciones de linfocitos B se observó al comparar con controles sanos (73, 75 y datos nuestros no publicados). Sin embargo, en el líquido sinovial de pacientes con AR existen linfocitos B CD20+ CD38- con respuesta proliferativa defectuosa (78). Entonces, las alteraciones en los subtipos de los linfocitos B son diferentes para cada enfermedad. Los receptores tipo Toll también podrían estar involucrados en la selección de los linfocitos B en los CG (79), a través de la unión de complejos IgG-cromatina (80), y de la actividad del factor reumatoideo (FR) (80).

Tabla 1. Subtipos de linfocitos B maduros (Bm) dentro de los centros germinales.

Subtipos	IgD	CD38	CD23	CD27
Bm1 (virgen)	+	-	-	-
Bm2 (activadas)	+	+	+	-
Bm2' (encontradas en centros germinales)	+	++	+	-
Bm3 (centroblasto)	-	++	-	-
Bm4 (centrocito)	-	++	-	-
Bm5 temprano (anticuerpo o memoria)	-	+	-	-
Bm5 (anticuerpo - célula secretante)	-	-	-	+

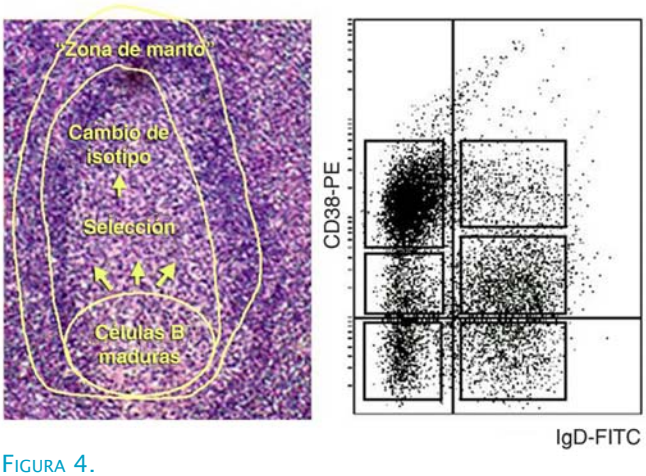


Figura 4.
Centro marginal donde los linfocitos B maduros entran.
El área de selección y la zona del manto son indicadas. La tinción de IgD y CD38 permite la identificación de los siete subtipos maduros de células B (Ver Tabla 1 y texto para detalles).

Funciones de los linfocitos B

Las células B son centrales en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Diferentes tipos de auto-Ac caracterizan estas patologías. La activación de linfocitos B policlonales es la alteración inmunológica más temprana y común en el lupus murino. Los linfocitos B producen espontáneamente Ig y cambian el isotipo sin la ayuda de los linfocitos T. Reininger et al (81) han demostrado *in vitro* que líneas celulares pre B de hígado de ratón son susceptibles para autoinmunidad, pero no las de ratones sanos, pueden diferenciarse en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) y producir altas concentraciones de autoanticuerpos (81). Ellos reafirman este concepto mostrando que las células pre B murinas producen una importante hiperglobulinemia en ratones con SCID (82).

Una gran cantidad de resultados han sugerido que los linfocitos B no son única y simplemente precursores de células secretoras de auto-Ac (83), y múltiples esfuerzos para clarificar su intervención en autoinmunidad se han llevado a cabo. Éstos han arrojado numerosas y provocativas conclusiones, que son difíciles de incorporar a un único modelo. Por ejemplo, estudios usando ratones MRL *lpr/lpr* genéticamente modificados que carecen de linfocitos B, ratones homólogos para la deleción *JH/JH*, revelaron que la nefritis no se desarrolló en éstos (Tabla 2) (84). La activación espontánea de linfocitos T estuvo inhibida en el ratón deficiente de linfocitos B y no se observó una

Tabla 2. Los linfocitos producen auto-anticuerpos.

Ausencia completa de células T infiltrantes en el ratón MRL *lpr/lpr* homólogo para la deleción *JH/JH*
El ratón IgM MRL/MpJ-Fas^{lpr} tiene inmunoglobulinas de superficie codificadas transgénicamente, pero estas no se secretan. Ellos desarrollan nefritis caracterizada por infiltración celular
Ref 84-86

infiltración linfocítica ni en la piel ni en los riñones. Estos resultados cuestionan la idea de que las enfermedades autoinmunes son estrictamente debidas a inmunocomplejos (IC). Experimentos posteriores del mismo grupo, mostraron que ratones con linfocitos B no secretantes de Ig, por ejemplo el ratón IgM MrL/Mpj-Fas^{lpr}, desarrollaban nefritis caracterizada por infiltración de linfocitos T. Por tanto, el rol esencial de los linfocitos B en la nefritis puede no estar mediado por los auto-Ac. ¿Cómo asociar estos hallazgos con las observaciones previas que asocian la nefritis con los IC circulantes que contienen anti-DNAds, inducidos por transferencia pasiva de auto-Ac monoclonales o policlonales y debida al depósito de estos IC? Los linfocitos B están ahora, dotados de diversas funciones (Tabla 3). De este modo, en ratones diabéticos no obesos los linfocitos B son un requisito, aunque el proceso autoinmune es promovido por los linfocitos T activados (86).

TABLA 3. Funciones de células B, además de la producción de anticuerpos.

1.	Formación de la arquitectura esplénica: células dendríticas y linfocitos T.
2.	Presentación antigénica (en particular células B CD5 y productoras de factor reumatoide).
3.	Producción de citoquinas que dirigen la diferenciación de linfocitos T vírgenes a T ayudadores (Th) Th1 o Th2.

Influencia de los linfocitos B en las células vecinas

Reciente evidencia indica que el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), la linfotoxina A (LTA) y la linfotoxina B (LTB) están implicados en el inicio y mantenimiento de la arquitectura normal esplénica: ratones "knockout" (KO) para la LTA (87), la LTB (88), el receptor-I del TNF-α (89) y el TNF-α (90) tienen una estructura esplénica anormal, así como los ratones con vías de señalización alteradas para la LTA y la LTB. Aunque todavía no es claro por qué estos defectos crean tales alteraciones en la arquitectura esplénica, es más intrigante el motivo por el cual el sistema de células dendríticas (CD), las cuales son componentes esenciales de los FL, están ausentes en ratones KO para el TNF o la LT (87–90). Las relaciones entre todos estos actores fueron inicialmente sugeridas con base en ratones con SICD, los cuales carecen de linfocitos B maduros y de CD (91). Otros estudios demuestran el protagonismo de los linfocitos B en la ontogénesis de las CD ya que describen que los linfocitos B inducen la aparición de CD por la expresión de LTA de membrana (92). Cerny, Zinkernagel y Groscurth (93) reportaron que las CD se encuentran ausentes en los órganos linfoides de ratones depletados de linfocitos B.

Como la diferenciación de los linfocitos T puede otorgar susceptibilidad para enfermedades autoinmunes, las vías de su activación en células T ayudadoras (Th) Th1 y Th2 han sido investigadas. Por ejemplo, se ha contemplado que la unión del receptor OX40 a su ligando OX40L en las CD coordina la selección, migración y diferenciación mediada por citoquinas Th1 - Th2, ayudando a los linfocitos B a penetrar a los CG (94). No obstante, parece que la interacción específica de linfocitos B y T con el antígeno, junto con la unión del receptor OX40 de los linfocitos T activados al OX40L de los linfocitos B estimulados, induce la producción de IL-4, restringe la síntesis de interferón-γ (IFN-γ) y favorece la diferenciación a Th2 y CP bajo la influencia de esta IL-4 recién liberada (95). En paralelo, en algunos modelos murinos se ha establecido que los linfocitos B son necesarios para la inducción de sensibilidad del contacto de los linfocitos T (96). Entonces, los linfocitos B influyen en la formación de CD foliculares, en la forma de migración de los linfocitos T, también como en su diferenciación y en la sensibilidad del contacto. En este contexto de citoquinas Th1/Th2, el TNF-α que es liberado por macrófagos activados por linfocitos T (97), puede ser protector en pacientes con LES (98).

Linfocitos B como células presentadoras de antígeno

Los linfocitos B cumplen con la función de células presentadoras de antígeno (CPA): un antígeno específico del linfocito B es tomado, internalizado, procesado y presentado como Ag a los linfocitos T e incluso a otros linfocitos B (99). Este proceso no sólo mejora la inmunidad celular mediada por linfocitos T, sino que amplifica la respuesta final de Ac (Figura 5). Los linfocitos B1a se caracterizan por la expresión en su membrana de auto-Ac multiespecíficos y por tanto, son apropiados para presentar los

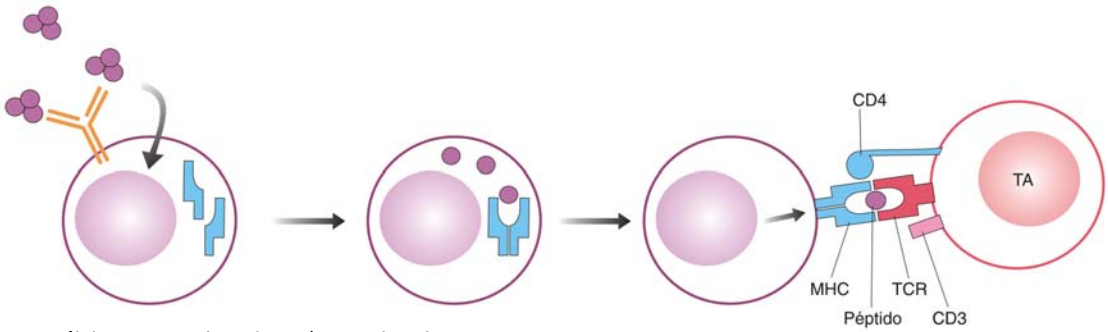


FIGURA 5.
El linfocito B como célula presentadora de antígenos (CPA), toma, internaliza, procesa y presenta péptidos de antígenos nominales a una célula T auxiliar (TA) o a otra célula B.

autocomponentes a otras células como los linfocitos B1 y B2 o los linfocitos T. Los linfocitos B1a esplénicos han sido señalados como potentes CPA, ya que inducen que los linfocitos T de ganglios linfáticos liberen dos veces mayor nivel de IFN-γ que los linfocitos B2, en el modelo murino de lupus NZBM2410 (100). Roosnek y Lanzavecchia (101) han propuesto que las células B que unen IC Ag (IgG)/Anti-Ag (Anti-IgG) a través del FR de membrana, presentan más pronto el antígeno. Es posible que el FR fisiológico provenga de la población B1. Esto reafirma el concepto del FR como un mediador inflamatorio (102). Aún más, desde hace poco se propone que la activación de los linfocitos T es dependiente de los linfocito-B en AR (103). Los tejidos sinoviales que están infiltrados por linfocitos T, macrófagos y CD pero que carecen de linfocitos B, no mantienen la activación de clones de linfocitos T transferidos, dejando de esta manera la posibilidad de que los linfocitos B tengan una función crítica en la activación de los linfocitos T o alberguen un Ag relevante. De hecho, la presentación antigénica involucra la participación de linfocitos B como CPA con el Ag unido al MHC y a los linfocitos T (104), proceso activo y complejo, conocido como sinapsis inmunológica (105). Esta organización pone a los linfocitos B, más que todo a aquellos con especificidad para el DNAds, como una CPA crítica en la presentación de Ag. Las células B podrían estar involucradas en el desarrollo de respuestas autoinmunes de las células T.

Producción polarizada de citoquinas por linfocitos B

Las citoquinas han sido implicadas en la actividad de la enfermedad y en el compromiso orgánico. Por ejemplo, la IL-6 (que estimula los pasos finales de la maduración de los linfocitos B) es producida en abundantes cantidades en LES (106). La disregulación de la actividad de los linfocitos B podría ser independiente de los linfocitos T en LES, por la expresión constitutiva de los receptores de IL-6 y su papel en la función celular (107). Es más, ésta citoquina promueve el LES (108), mientras que el bloqueo de su receptor previene el daño renal en el ratón F1 (NZB X NZW) (109). Otra candidata es la IL-10 (110), tal como lo han señalado 6 experimentos: 1) linfocitos B1a son la principal fuente de IL-10 derivada de células B (111); 2) el tratamiento continuo de ratones normales con Ac contra la IL-10 depleta los linfocitos B1, pero no los linfocitos B2 (112); 3) oligodesoxinucleótidos sin-sentido específicos contra el mRNA de la IL-10 inhiben *in vitro* el crecimiento de la leucemia murina de células B1 (113); 4) la IL-10 está involucrada en la hiperactividad de los linfocitos B autorreactivos (114) y se encuentra aumentada en el suero de pacientes con LES (115); 5) la administración de antagonistas de la IL-10 a pacientes con LES refractario es beneficiosa (116) en el manejo y; 6) nosotros (47), hemos separado clases de linfocitos B1a, B1b y B2 de ratones normales y KO para IL-10 y hemos identificado mRNA de la IL-10. La IL-10 puede operar en conjunto con la IL-9 (117) o el factor-1 derivado de las células estromales (118) en los linfocitos B.

El concepto de que existen dos distintas subpoblaciones de linfocitos T, Th1 y Th2, ha sido sustentado durante años. Estas células efectoras producen espectros diferentes de citoquinas, dependiendo de la clase de respuesta requerida frente a un Ag particular. Es conocido que las células Th1 secretan IFN-γ e IL-2, mientras las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-6 (119). Estas últimas citoquinas trabajan en la activación y maduración de los linfocitos B. Adicionalmente, las citoquinas de Th1 aumentan la producción de linfocitos Th1, mientras que inhiben la producción de linfocitos Th2 y viceversa. Los linfocitos B producen citoquinas, tal como la IL-10, IL-6 y TNF-α, aunque a bajos niveles, pero adquieren la habilidad de expresar IL-2, IFN-γ, IL-4 e IL-12 cuando son estimulados por un Ag en presencia de linfocitos Th1 (120-123).

Estudios recientes (Figura 6) indican que los linfocitos B vírgenes se diferencian en linfocitos B con diferentes perfiles de citoquinas, después de la estimulación antigénica y del efecto polarizante de Th1 y Th2. Los linfocitos B polarizados han sido llamados efectores (Be) Be1 y Be2 (124). Una vez generados estos linfocitos B, imparten capacidades funcionales a los linfocitos T. Por eso los linfocitos Be1, por virtud de su producción de IFN–γ y la presentación de Ag específicos a los linfocitos T, promueven la expansión de células Th1, mientras que la IL-4 liberadas por linfocitos Be2 favorece el desarrollo de células Th2. De aquí que, las células Be1 y Be2 se comporten como las CPA más clásicas, que potencialmente regulan el perfil de la respuesta inmune. El hecho de que los linfocitos Th1/Th2 y Be1/Be2 tengan regulación cruzada en la diferenciación de los linfocitos T y B vírgenes, aumenta la posibilidad de que exista un mecanismo de amplificación secuencial. Si se encontraran fuera de control, tales linfocitos B podrían conducir al desarrollo de autoinmunidad (125). El origen preciso de los linfocitos Be1 y Be2 permanece, sin embargo, en espera de ser definido. Esta retroalimentación positiva es más probable que ocurra en los sitios de inflamación, debido a que, por ejemplo, la cantidad de linfocitos Be1 y Be2 en LES no ha mostrado diferencias entre pacientes y sujetos normales (126).

La tolerancia del linfocito B y su alteración

I. El receptor del linfocito B (BCR)

El antígeno se une al receptor del linfocito B

El Ag encontrado en el BCR es un punto esencial para evaluar la tolerancia a lo propio. Trabajos recientes han aportado nuevos conocimientos en la estequiometría de sus componentes (127). El BCR consiste en una subunidad de unión, una Ig de membrana y una subunidad de señalización con proteínas Ig-α (CD79a) e Ig-β (CD79b). Estos ectodominios semejantes a las Ig son necesarios para

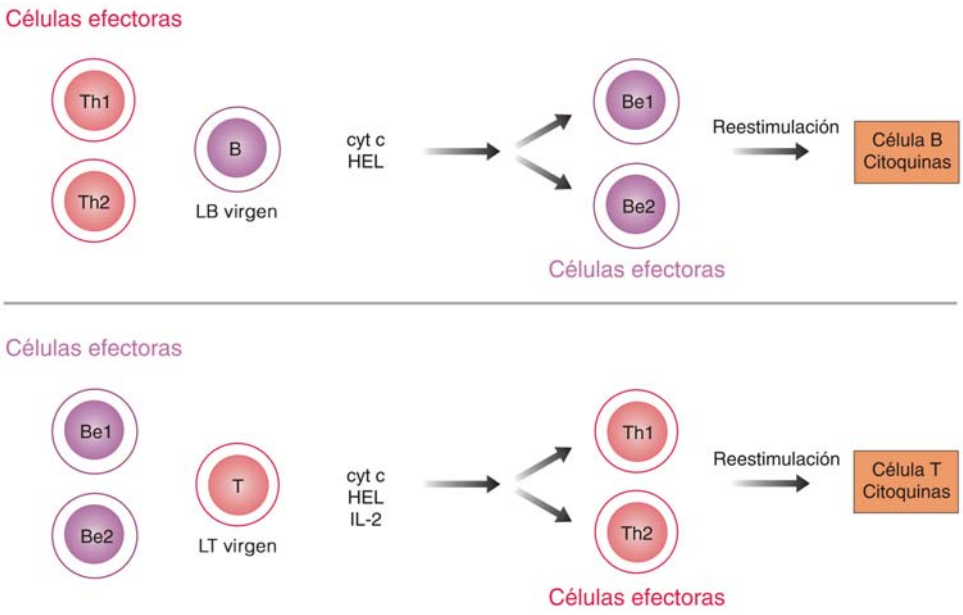


FIGURA 6.
Los linfocitos T ayudadores (Th) Th1 ó TH2 promueven la emergencia de linfocitos B efectores (Be) 1 ó 2. A la vez, Be1 ó Be2 favorece a Th1 ó Th2. Adaptado de Harris et al. (ref 124).

que el BCR pase del retículo endoplásmico a la superficie celular, y sus colas intracitoplasmáticas contienen motivos de activación asociados a tirosina (ITAM), que se constituyen como sitios de unión de la PTK y ayudan para la subsiguiente transducción de la señal. Las interacciones de alta afinidad entre el auto-Ag y la Ig de membrana producen apoptosis de los linfocitos B inmaduros (128). El proceso de maduración para el exo-Ag, es un proceso crucial que se lleva a cabo en el CG (129): los centroblastos presentan hipermutaciones y a medida que la reacción continúa, los centrocitos emergen, ya sea como células con baja afinidad que resisten la apoptosis, o como células de alta afinidad por el Ag que se convierten en células formadoras de Ac. De esta manera, los receptores para los Ag regulan positiva o negativamente la supervivencia, migración y diferenciación de los linfocitos.

La maquinaria de transducción

La activación con Ag, o anti-IgM, los cuales se comportan como señales para Ac, cambia un número de PTK, incluyendo *Lyn* y *btk,* las cuales son miembros de la familia-*src*, y *sik* que comparte homología con la proteína 70 asociada a ζ del linfocito T (128-132). Corriente abajo, las vías de transducción del fosfatidilinositol-3 quinasa y de la serina/treonina quinasa Akt, poseen la habilidad de prevenir la apoptosis. Estas promueven la supervivencia celular activando la protein-quinasa C (PKC), e involucrando las tres familias de quinasas activadoras de mitógenos (MAP): p38, las familias C-*Jun* terminal-NH2 quinasa (ambas proapoptóticas) y familia de quinasas reguladas extracelularmente (la cual es antiapoptótica). Una vez activada la fosfolipasa C-γ produce diacilglierol e inositol-1,4,5-trifosfato del 4,5-bifosfato fosfatidilinositol de membrana. Estos mensajeros son requeridos para la activación de PKC y la liberación de calcio (Ca^{2+}), respectivamente. Las MAP quinasas luego son activadas por PKC, la cual ha sido fosforilada por el calcio intracelular que ha sido recién movilizado. Alguna o ambas vías de señalización pueden ser alteradas, lo que ofrece nuevos blancos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

Compromiso de la tolerancia

Avances contrastantes han sido descritos con respecto a la selección positiva de linfocitos B maduros por auto-Ag. Existe, así mismo, evidencia contundente que el reclutamiento de los linfocitos B maduros de vida corta en el pool recirculante, es dependiente de la unión al BCR de tales autoAg (133, 134). Mecanismos adicionales de auto-tolerancia periférica han llevado al silenciamiento de linfocitos B maduros que han evadido la tolerancia central. De manera interesante, por una disminución en la regulación de la expresión del BCR de superficie, los linfocitos B (135,136) aún generan señales de supervivencia mediadas por BCR constitutivos, mientras que el nivel de señalamiento requerido para su apoptosis no puede ser alcanzado. Aberraciones moleculares han sido también observadas en diversos contextos autoinmunes (137). Estas incluyen defectos de la señalización (138) y apoptosis anormal (134) de linfocitos autorreactivos. Claramente, los auto-Ag están involucrados aquí, porque la mayoría de los blancos en LES están encerrados en los cuerpos apoptóticos (139), y tal localización intracelular predispone para la producción de auto-Ac (139). De estas observaciones se puede deducir que el señalamiento es anormal en LES y que esta anormalidad provee una base bioquímica y molecular para la activación o la muerte celular.

II. Mecanismos de auto tolerancia

Regulación del umbral de señalización

A pesar de la profusión y la complejidad de los mecanismos involucrados para alcanzar la tolerancia, éstos están a prueba de todo. Durante el curso de una respuesta

inmune, los coreceptores elevan y bajan el umbral del BCR, modulando la activación de las moléculas requeridas para la transmisión de la señal (Figura 7). La maquinaria de transducción es estimulada por el CD19 y CD21, e inhibida por el CD22 (141), CD72 (142) y CD5 (39). El último receptor está física (143) y funcionalmente (144) asociado con el BCR y, sorpresivamente, los linfocitos B equipados con el receptor CD5 expresan más el CD5-ligando, CD72, que los linfocitos B CD5- (145). La relevancia de esta observación no es clara. Es interesante que la unión de CD5 resulte en apoptosis del linfocito B en reposo, pero no así en el linfocito T en reposo (146), mientras que el anti-CD5 aumenta la respuesta proliferativa de células B1a activadas con anti-IgM e IL-2 (147).

El CD32, que es uno de los receptores para la fracción Fc de la IgG, también está involucrado en prevenir la respuesta del BCR (148). En contraste, a pesar de su papel potente como regulador de las respuestas inmunes timoindependientes y de la vida de los linfocitos B, nosotros encontramos que los niveles del coreceptor CD22 eran normales en linfocitos B de pacientes con LES (149). Todas estas glicoproteínas (Figura 8) albergan ITAM y motivos de inhibición asociados a tirosina (ITIM), los cuales

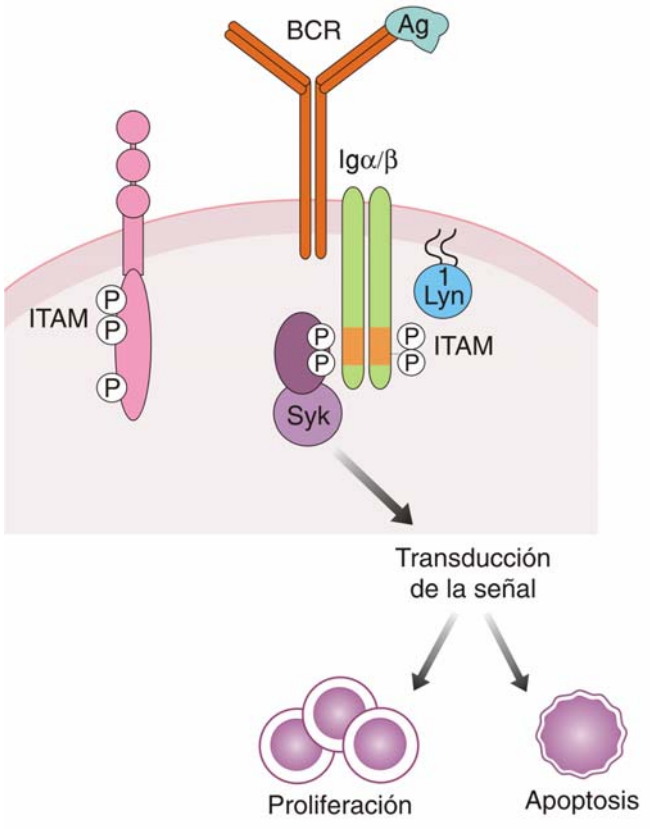


Figura 7.
El umbral de señalamiento del BCR es regulado positivamente por CD19 y CD21, y negativamente por CD5, CD22 y CD72. Los mediadores son las tirosinfosfoquinasas y las proteinquinasas (PKC) por un lado, y por el otro las proteínas tirosinfosfatasa-1 contenedora de SH2 (SHP)-1 y la inositol polifosfato 5-fosfatasa contenedora de SH2 (SHIP).

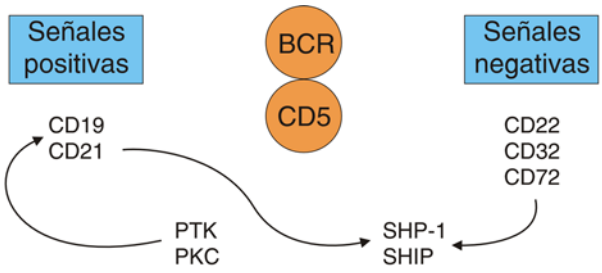


Figura 8.
El receptor de célula B (BCR) es una IgM asociada a la membrana con el heterodímero Ig-α/Ig-γ que contiene la unidad de transducción inmunoreceptora de motivos asociados en tirosina (ITAM). Hay un número de coreceptores, entre ellos CD5. Las tirosinfosfoquinasas están localizadas en la vecindad del BCR tal como *Lyn* y *Syk*.

reclutan PTP para reversar los efectos de PTK, *viz* proteína tirosin-fosfatasa contenedora SH2 (SHP, del inglés SH2-containing protein tyrosine phosphatase)-1 para CD22, CD72 y CD5 (150) e inositol polifosfatasa 5-fosfatasa contenedora de SH2 (SHIP, del inglés SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase) para CD32 (151). *Lyn* es requerido para fosforilar CD22 y para unir SHP-1 al complejo CD22/BCR. Ratones en los cuales *Lyn*, CD22 o SHP-1 han sido alterados tienen linfocitos B hiperactivos secretantes de auto-Ac. Una enfermedad semejante al lupus se desarrolla en aquellos que carecen del gen que codifica ITIM (152) o Lyn, CD22 o SHP-1 (153).

Esta regulación negativa está normalmente confinada a correceptores que amplifican la señal. Ellos incluyen varias isoformas, RA, RB, RC y RO del CD45 (154) y en particular, el CD19 que es crítico para el desarrollo de linfocitos B y de la inmunidad humoral (155). Aumentar la densidad de la expresión del CD19 lleva a mayor respuesta de los linfocitos B frente a estímulos transmembrana e induce la producción de FR y anticuerpos anti-DNAds. Como resultado, incrementos modestos en la expresión o el efecto de este complejo pueden cambiar el balance entre la tolerancia y la inmunidad a autoinmunidad. Es como, pacientes con SSc sobreexpresan CD19 por tan poco como el 20% (156). En el ratón de piel-compacta, un modelo para SSc humano, el CD19 exhibe aumento de la fosforilación de la tirosina (157) y una asociación de los polimorfismos del gen correspondiente con susceptibilidad para LES ha sido sospechado en japoneses (158). Estos hallazgos indican que los coreceptores son regulados a través de interacciones moleculares en la superficie de las células B y algún defecto puede promover autoinmunidad.

Anergia de linfocitos B autorreactivos.

La estimulación constante de BCR por auto-Ag transmite señales de tolerancia por activación de procesos de retroalimentación que convierten a la célula anérgica. Por ejemplo, esta activación media la tolerancia al DNAds y a las ribonucleoproteínas (159). De nuevo, la tolerancia es gobernada por el comienzo de la señalización por el BCR

(160). Hippen et al (161) han demostrado en ratones doblemente transgénicos (Tg) (Figura 9), que el CD5 contribuye a mantener la tolerancia de los linfocitos B anérgicos: aquellos linfocitos B de ratones Tg para Ac anti-lisosima de huevo de gallina (HEL - hen egg lysozyme) y Ag HEL de membrana, van a apoptosis debido a su robusta activación. Ellos llegan a ser anérgicos si los ratones son Tg para HEL soluble, pero esta tolerancia se pierde si este modelo de anergia de linfocitos B es producido sobre la base de CD5-KO.

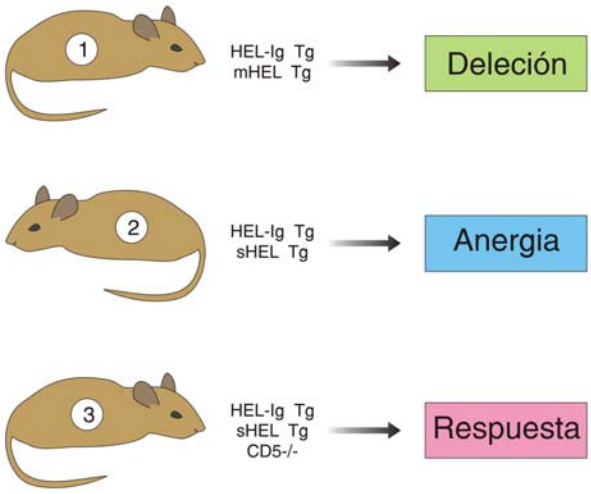


FIGURA 9.
Las células B transgénicas (Tg) de Ig anti-lisozima de huevo de gallina (HEL – Hen Egg Lysozime) son borradas si el ratón es Tg para HEL de membrana (m), anergizada si es Tg para HEL soluble (s) y activado si este modelo de anergia es llevado al modelo murino CD5-/-. Adaptado de Keli y col. (ref 159-161).

Cambios secundarios en la especificidad del BCR

La importancia de los auto-Ag en la selección negativa en la MO ha sido descrita hace poco tiempo. Sin embargo, ha sido difícil de evaluar si los auto-Ag también juegan un papel en la selección positiva de los linfocitos B (162). En vista de las numerosas observaciones, este concepto parece ser esencial. Por cambios en la especificidad del BCR en la MO, los linfocitos B autorreactivos, pueden iniciar nuevos reordenamientos en la cadena liviana de la Ig (163,164). El sistema puede de esta manera liberarse de los BCR autorreactivos generados en el proceso de recombinación, no sólo por la deleción clásica, sino también por continua recombinación (165). Estos linfocitos B inmaduros que experimentan la edición de este receptor transcriben genes de activación de la recombinación (RAG, del inglés recombinase-activating genes), RAG1 y RAG2, y sintetizan endonucleasas de secuencia específica de señales de recombinación que activan las reorganizaciones V (D) J (166). Los genes son luego extinguidos por un mecanismo de retroalimentación iniciado por el BCR.

No obstante, los genes de receptores de Ag pueden ser reactivados en respuesta a Ag en linfocitos B maduros en OLS. Esta reactivación es soportada por la descripción de rearreglos secundarios en un número de sistemas: por ejemplo, RAG 1 y RAG 2 pueden ser reexpresados en una subpoblación de linfocitos B maduros murinos activados dentro de CG de ganglios linfáticos de drenaje (166), bazo y placas de Peyer (167). Eventos similares han sido recientemente reportados que ocurren en linfocitos B humanos de las amígdalas (168). Si una vez reexpresados, los productos del gen RAG son funcionales, un receptor Ig de superficie no favorable obtiene la oportunidad adicional de ser reevaluado, y los linfocitos B autorreactivos originados por hipermutaciones en el centroblasto del CG consiguen una inesperada oportunidad de escapar a la deleción. Alternativamente, la interpretación ha asegurado que el nuevo ensamblaje del BCR en las células que fallan en la unión del Ag puede contribuir a la diversificación del repertorio para mejorar la afinidad del receptor (169). De hecho, la visión que la unión del Ag al receptor (170) apague la maquinaria de recombinación V (D) J en los linfocitos B de las amígdalas humanas para bien, tiene que ser revisado a fondo.

Usando la técnica de "single-cell sorting", y tres PCR mediadoras de ligamento de RT-PCR en un y único linfocito B, hemos demostrado últimamente (171), que los linfocitos B CD5+ maduros activos en las amígdalas humanas expresan el gen RAG y el mRNA, ensamblan proteínas y exhiben la hendidura de DNA resultante de su activación. En nuestras manos, la tinción con inmunofluorescencia doble (Figura 10) permite la detección de las dos enzimas correspondientes en un tercio de linfocitos Bm2 CD5+. Para poder dilucidar la relación entre la expresión de CD5 y la transcripción de *RAG*, los linfocitos Bm1 y Bm2 CD5-, fueron clasificados y estimulados con anti-IgM y CD40-ligando. Una población de CD5+ fue generada y RAG1 y RAG2 se coexpresaron en estos linfocitos B1 artificiales. Se puede especular que el control de la expresión de CD5 y/o la revisión del receptor antes que las células entren al CG puede ser inadecuado en las enfermedades sistémicas autoinmunes y llevar a la producción de células secretoras de auto-Ac.

III. Respuesta del receptor antigénico

El modelo de las "balsas lipídicas"

Después de la unión, el BCR, junto con las proteínas de señalización, se divide en microdominios en la membrana celular los cuales son ricos en colesterol y gangliósido M1 y son denominados "balsas lipídicas" (Lipid Rafts-LR) (172). La depleción experimental de colesterol con α-metil-ciclodextrin impide la proliferación, indicando que estos microdominios son críticos para la transducción. Ellos pueden ser visualizados por medio de la toxina B del cólera conjugada con 594 Alexa Fluor que se une al gangliósido M1, y el BCR con anti-IgM conjugada con fluoresceína. El extendido (Figura 11) de LR teñidos de rojo e

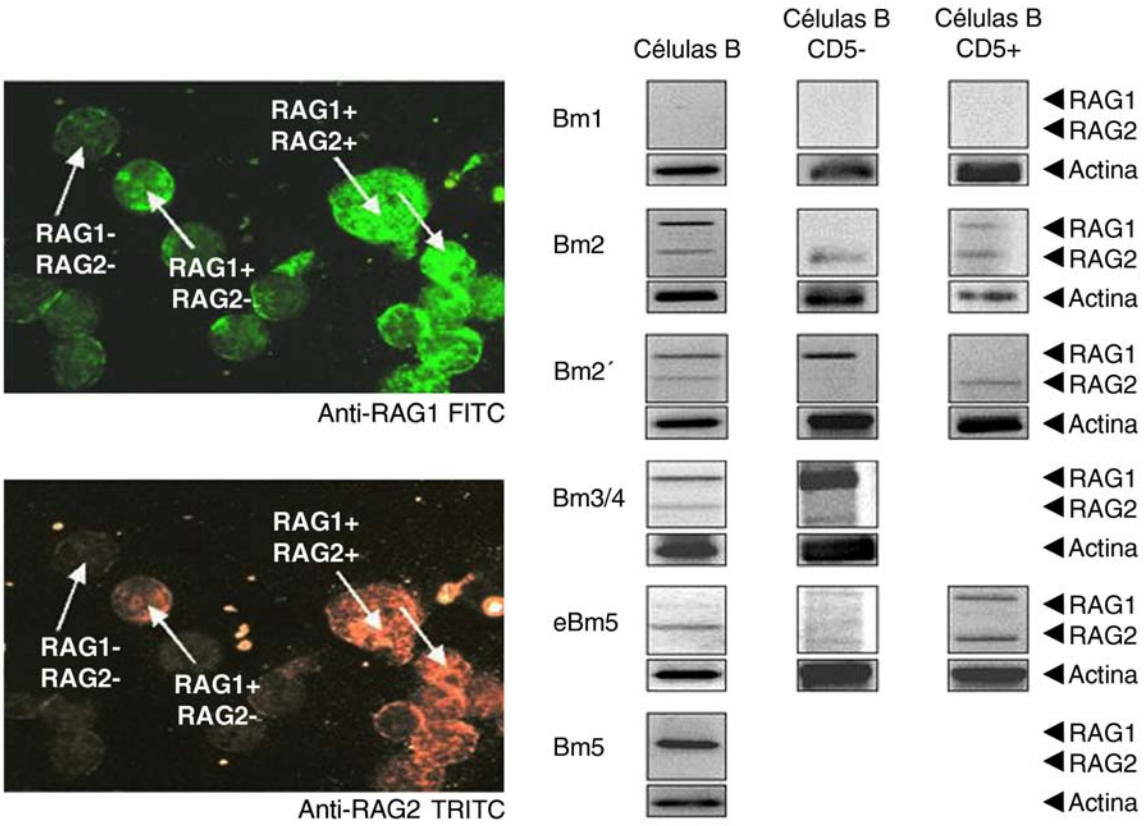


FIGURA 10.
Los genes activadores de la recombinación (RAG)-1 y -2 son transcritos de nuevo (como es mostrado por single-cell sorting y por PCR de transcriptasa reversa) y permite la síntesis de estas enzimas (como es mostrado por la doble tinción de linfocitos B girados). Adaptado de Hillion, Youinou y Jamin (ref 171).

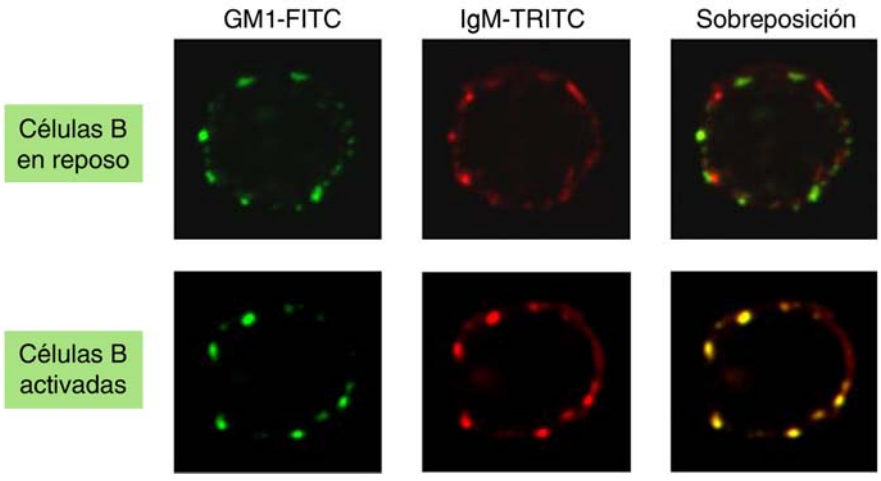


FIGURA 11.
En este modelo de balsa lipídica (LR), la LR es teñida de rojo con la toxina B del cólera conjugada con 594 Alexa Fluor que une al ganglíosido M1, y los receptores de células B (BCR) teñidos con verde con el Ac anti-mu conjugado con fluoresceína. La sobreposición se ve amarilla en células BCR activadas.

IgM teñida de verde es visto amarillo en los linfocitos B activados, pero no en linfocitos B en reposo, reflejando que el BCR se ha movido entre estos microdominios de transducción.

Un mecanismo por el cual el CD19 y CD32 pueda modular este proceso es prolongar su residencia dentro el LR, o bloquear la señal. El CD19 retrasa la exclusión del BCR del LR (173), mientras que el CD32 recluta SHIP (174). Este esquema es reforzado por el reporte actual que la composición del LR está alterada en LES (175) y por nuestros hallazgos (Figura 12) en los que el BCR reside en el LR de pacientes de SSp más tiempo que en aquellos de controles normales (Arbonneau, Pers, Saraux, Devauchelle, Pennec y Youinou, resultados no publicados), mientras que la entrada en los dominios es inhibida en linfocito-B tolerantes (176).

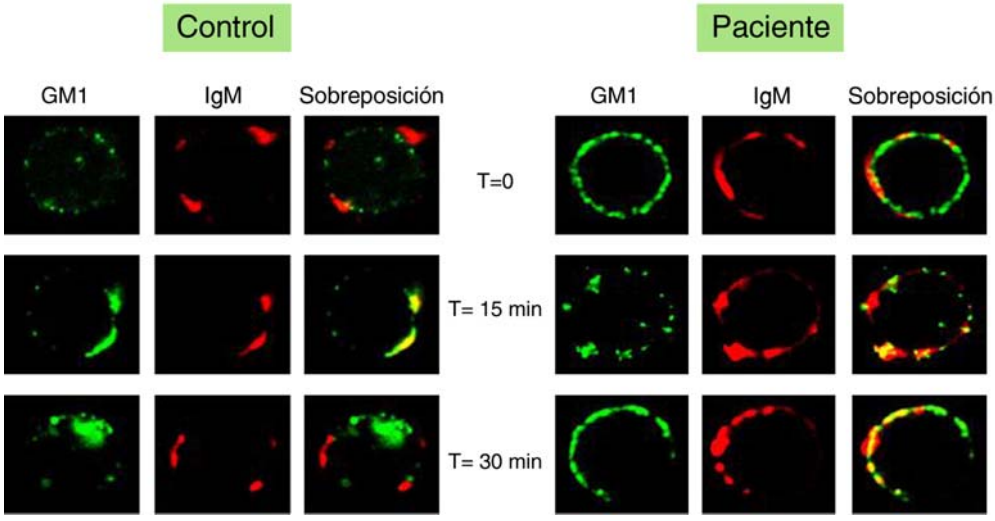


FIGURA 12.
Cinética de la residencia del antígeno en la célula B en la balsa lipídica. Esto es anormalmente grande en linfocitos B de un paciente con síndrome de Sjögren primario.

Factores de supervivencia, citoquinas.

El destino de los linfocitos B está también controlado por factores de supervivencia. Una de las más potentes citoquinas descritas, es el factor activador de células B de la familia del TNF (BAFF). Su administración protege a los linfocitos B de apoptosis, incrementa su número y promueve la producción de auto-Ac específicos de enfermedades sistémicas autoinmunes (177). Adicionalmente, los pacientes con LES (178), AR (179) y SSp (180) presentan elevados niveles de BAFF. Estos se relacionan con el título de auto-Ac en SSp (168,180,181). Es interesante que la citoquina es producida en sitios de inflamación (182 – 183, y Daridon, Pers, Saraux, Devauchelle, Pennec y Youinnou, datos no publicados), pero no sorprende que BAFF sea aberrantemente expresado por linfocitos B (184) rescatados de la apoptosis en la leucemia linfocítica crónica (185). Tres receptores semejantes han sido descubiertos para este factor de crecimiento: Ag de maduración de células B (BCMA, del inglés B cell maturation Ag), receptor ligando de ciclofilina y activador transmembrana modulador de calcio (TACI) y el tercer receptor BAFF (BR3). BAFF es un regulador positivo cuando se une a BR3, pero es esencial que su sobreexpresión beneficie exclusivamente a los linfocitos B autoreactivos y facilita su migración hacia microambientes que de otra manera resultan prohibidos (186), tal como la membrana sinovial en AR o las glándulas exocrinas en SSp. En contraste, BCMA es innecesario para la activación de los linfocitos B y el TACI inhibe este proceso. Otro avance notorio, ha sido demostrar que BAFF sobrerregula la expresión del CD19 (187), lo cual es consistente con el hecho que los linfocitos B tienen más moléculas CD19 en pacientes con SSc (156) o SSp (Arbonneau, Pers, Saraux, Devauchelle, Pennec y Youinou, resultados no publicados), con respecto a individuos normales. Esta proposición de auto-tolerancia de los linfocitos B es quizás la base de la autoinmunidad asociada con la sobreexpresión de BAFF.

Después de su liberación por los linfocitos B, la molécula CD5 se comporta de la misma manera (188, 189). Este coreceptor puede interactuar con uno de sus ligandos, tal como CD72, competir por la ocupación del receptor (190) y entregar una señal coestimuladora (191) a linfocitos B en reposo.

Regulación genética de la expresión de CD5

Hemos recién identificado (192, y Renaudineau, Vallet, Le Dantec, y Youinou, resultados no publicados), un nuevo motivo regulatorio arriba de la región no codificante del gen *cd5*: éste fue llamado E1B. Comparado con el conocido exón 1, llamado E1A, éste revela un nuevo nivel de regulación de CD5. Esto fue demostrado tanto a nivel transcripcional y como traduccional. El transcripto que contiene a E1B codifica una proteína truncada que es retenida intracelularmente. Luego, la cantidad de transcriptos que contienen E1A es infraregulada y la expresión de la proteína en la membrana disminuye. La translocación de SHP-1 (que reduce la señal del BCR) es prevenida y por tanto la activación de la célula. Estudios de células transfectadas podrían insinuar una relación estrecha entre el gen y la síntesis de la molécula CD5. En este sentido, el poder de la señal mediada por el BCR podría liderar la expansión de linfocitos B autorreactivos.

Conclusión

Por último, las enfermedades autoinmunes pueden ser divididas en tres familias: dominadas por los linfocitos B, dominadas por los linfocitos T y mixtas. Las anormalidades de los linfocitos B están, sin embargo, esperando para ser incorporadas en esquemas fisiopatológicos. Los datos de investigaciones promisorias están en proceso de ser trasladados a la clínica. En este momento, puede seguramente asumirse que la depleción de linfocitos B desde los estadíos de pre-B a células B maduras, tiene un papel por desempeñar en el manejo del LES (193), la granulomatosis de Wegener, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la miastenia gravis y la dermatomiositis (194, 195). Hemos recientemente aplicado la terapia anti-CD20 a SSp con resultados alentadores (Saraux, Devauchelle, Ar-

bonnaeu, Pers y Youinou, datos no publicados). Los Ac anti-IL6 (196) y anti-CD40L (197) parecen eficientes y el bloqueo de PKC o CD19 también ha mostrado ser promisorio en el manejo del LES (194). Los reumatólogos deben estar atentos de los antagonistas de BAFF, Ac monoclonales (197) o los atrayentes de BAFF, tal como el TACI soluble codificado en adenovirus (198), para disminuir la progresión del estado autoinmune (196). Desafortunadamente, existen pocos datos clínicos disponibles. Basado en la regulación de PTP y PTK (199), terapias nuevas dirigidas a modular la función de los linfocitos B deben ser diseñadas en el futuro cercano (200). Aún, mucho permanece por aprenderse sobre la importancia de las células B en el desarrollo de enfermedades sistémicas autoinmunes.

Referencias

1. Smith HR. Immunopathogenesis of lupus nephritis. Contrib Nephrol 1985;45:175-180
2. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the T cells in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1992;35:729-735
3. Fox RI, Carstens SA, Fong S, et al. Use of monoclonal antibodies to analyze peripheral blood and salivary gland lymphocyte subsets in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1982;25:419-426.
4. Hoffman RW. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Front Biosci 2001;6:1369-1378.
5. Peter JB, Shoenfeld Y. Autoantibodies. Elsevier Science, Amsterdam, 1996,880 pp.
6. Tomer Y, Buskila D, Shoenfeld Y. Pathogenic significance and diagnostic value of lupus autoantibodies. Int Arch Allergy Immunol 1993; 100:293-306
7. Theophilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine systemic lupus erythematosus. Immunol Rev 1981;55: 179-216
8. Youinou P, Revelen R, Bordron A. Is anti-endothelial cell antibody the murder weapon in systemic sclerosis? Clin Exp Rheumatol 1999; 17:35-36
9. Lernmark A. Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? J Clin Invest 2001;108:1091-1096
10. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. Nature Immunol 2001;2:764-766
11. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. N Engl J Med 2001; 345:340-350
12. Hirose S, Jiang Y, Hamano Y, et al. Genetic aspects of inherent B-cell abnormalities associated with SLE and B-cell malignancy: lessons from New Zealand mouse models. Inter Rev Immunol 2000;19:389-421
13. Klinman DM, Steinberg AD. Systemic autoimmune diseases arise from polyclonal B cell activation. J Exp Med 1987;165:1755-1760.
14. Clark J, Bourne T, Salaman MR, et al. B lymphocyte hvperactivitv in families of patients with systemic lupus ervthematosus. J Autoimmun 1996;9:59-65
15. Youinou P, Semana G, Muller S, et al. Interaction between HLA class I1 determinants and TCR b elements promote the antibody production to extractable nuclear antigen-related peptides. Hum Immunol 1997; 52: 12-21
16. Youinou P, Le Goff P, Merdrignac G, et al. The relation between CD5-B lymphocytes in rheumatoid arthritis patients and their relatives. Arthritis Rheum 1990;33: 339-348
17. Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, et al. Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. Ann Intern Med 1984;101:748- 756.
18. Looney RJ. Treating human autoimmune disease by depleting B cells. Ann Rheum Dis 2002;61:863-866
19. Gorman C, Leandro M, Isenberg D. Does B cell depletion have a role to play in the treatment of systemic lupus erythematosus? Lupus 13:312-316
20. Boumsell L, Bernard A, Lepage V, et al. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. Eur J Immunol 1978;8:900-904
21. Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, et al. Infrequent normal B lymphocytes express features of B chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 19982;155:623-628
22. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, et al. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. J Exp Med 1981;153:310-323
23. Youinou P, MacKenzie LE, Jouquan J, et al. CD5- positive B cells in patients with rheumatoid arthritis: phorbol ester-mediated enhancement of detection. Ann Rheum Dis 1987;46:17-22
24. Youinou P, MacKenzie LE, Le Masson G, et al. CD5-expressing B lymphocytes in the blood and salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. J Autoimm 1988; 1:185-1 94
25. Plater-Zyberk C, Maini RN, Lam K, et al. A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. Arthritis Rheum 1985;28:971-976
26. Dauphinee M, Tovar Z, Tala1 N. B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1988;31:642-647
27. Yamada H, Shimizu H, Taniguchi 0, et al. Leu-l (CD5) B cell subpopulation in patients with various liver diseases. Special reference to hepatitis B virus carrier and to changes causes by prednisolone therapy. Int Archs Allergy Appl Immunol 1988;87:409-416
28. Iwatani Y, Amino N, Kaneda T, Ichihara, et al. Marked increase of CD5+ B cells in hyperthyroid Graves' disease. Clin Exp Immunol 1989; 78:156-200
29. Ragheb S, Lisak RP. The frequency of CD5+ B lymphocytes in the peripheral blood of patients with myasthenia grows. Neurology 1990; 40:1120- 1124
30. Velasquillo MC, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D, et al. Some patients with primary antiphospholipid syndrome have increased circulating CD5+ B cells that correlate with levels of IgM antiphospholipid antibodies. Clin Exp Rheumatol 1991;9:501-505
31. Jones BM, Cheng IKP, Wong RWS, et al. CD5-positive and CD5-negative rheumatoid factor-secreting B cells in IgA nephropathy, rheumatoid arthritis and Graves' disease. Scand J Immunol 1993;38:575-580
32. Jarnis JN, Kaplan J, Fine N. Increase in CD5+ B cells in juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1992;35:204-207
33. Seidi OA, Semra YK, Sharief MK. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002;133:205-210
34. Anaya JM, McGuff HS, Banks PM, et al. Clinicopathological factors relating malignant lymphoma with Sjögren's syndrome. Semin Arthritis Rheum 1996;25:337-346
35. Lydyard PM, MacKenzie LE, Youinou P, et al. Specificity and idiotype expression of IgM produced by CD5+ and CD5- cord blood B cells. Ann NY Acad Sci 1992;651:527-535
36. Youinou P, MacKenzie L, Lamour A, et al. Human CD5-positive B cells in lymphoid malignancy and connective tissue disease. Eur J Clin Invest 1993;23:139-150
37. Broker BM, Klajman A, Youinou P, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells secrete multispecific autoantibodies. J Autoimmun 1988;1:469-481
38. Kipps TJ, Vaughan JH. Genetic influence on the levels of circulating CD5+ B lymphocytes. J Immunol 1987;139:1060-1064
39. Youinou P, Lydyard PM. CD5+B cells in nonorgan-specific autoimmune diseases: afresh look. Lupus 2001;10:523-525
40. Wortis HH, Berland R. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. J Immunol 2001;166:2163-2166
41. Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. Immunol Rev 2000;175:9-19.
42. Kantor A. A new nomenclature for B cells. Immunol Today 1991; 12: 388- 391
43. Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. Immunol Today 1999;20:312-316
44. Kassian MT, Ikematsu H, Casali P. Identification and analysis of a novel surface CD5-B lymphocyte subset producing natural antibodies. J Immunol 1992;148:2690-2702
45. Lalor PA, Herzenberg LA, Adams S, et al. Feedback regulation of murine Ly-1B cell development. Eur J Immunol 1989;19:507-513
46. Pers JO, Jamin C, Lydyard PM, et al. The H2 haplotype regulates the distribution of B cells into Bla, Blb and B2 subsets. Immunogenetics 2002;54:208-211

47. Pers JO, Jamin C, Youinou P, et al. Role of IL-10 in the distribution of B cell subsets in the mouse B1 cell population. Eur Cytokine Netw 2003;14:178-185
48. Anaya JM, Correa PA, Herrera M, et al. Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjögren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism. J Rheumatol 2002;29:1874-1876
49. Paavonen T, Quartey-Papafio R, Delves PJ, et al. CD5 mRNA expression and autoantibody production in early human B cells immortalized by EBV. Scand J Immunol 1990;31:369-374
50. Defiance T, Casamayor-Palleja M, Krammer PH. The life and death of a B cell. Adv Cancer Res 2002;86:195-225
51. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature 1983; 302:575-581
52. Osmond DG. The turnover of B cell populations. Immunol Today 1997; 14:34-37
53. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J Exp Med 1995;181: 2129-2140
54. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, et al, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. J Immunol 2001;167:6834-6840
55. Camacho SA, Kosco-Vilbois MH, Berek C. The dynamic structure of the germinal center. Immunol Today 1998;19:511-514
56. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nature Rev Immunol 2002;2:323-335
57. Liu YJ, Arpinc C. Germinal center development. Immunol Rev 1997; 156:111-126
58. MacLennan ICM. Germinal centers. Ann Rev Immun1994;12:117-139
59. Song H, Cerny J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent anti- gen. J Exp Med 2003;198:1923-1935
60. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J Clin Invest 2002; 109:59-68
61. Royer B, Cazals-Hatem D, Sibilia J, et al. Lymphomas in patients with Sjögren's syndrome are marginal zone B cell neoplasms, arise in diverse extranodal and nodal sites, and are not associated with viruses. Blood 1997;90:766-775
62. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad, et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2003;48:3187-3201
63. Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, et al. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:221-225
64. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, et al. Demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. Am J Patho1 2001;159:861-873
65. Youinou P, Morrow WJW, Lettin AW, et al. Specificity of plasma cells in the rheumatoid synovium. I. Immunoglobulin class of antiglobulin-producing cells. Scand J Immunol 1984;20:307-315
66. Cassese G, Lindenau S, de Boer B, et al. Inflamed kidney of NZB/w mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. Eur J Immunol 2001;31:2726-2732
67. Tengner P, Halse AK, Haga HJ, et al. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1998;41:2238-2248
68. William J, Euler C, Christensen S, et al. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside the germinal centers. Science 2002;297:2066-2070
69. Grammer AC, Lipsky PE. CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. Adv Immunol 2001;76:61-178
70. Grammer AC, Slota R, Fisher R, Gur, et al. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. J Clin Invest 2003;112:1506-1520
71. Liu YJ, Banchereau J. The paths and molecular controls of peripheral B cells development. Immunologist 1996;6:55-66
72. Grammer AC, Lipsky PE. CD154-CD40 interactions mediate differentiation to plasma cells in healthy individuals and persons with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2002;46:1417-1429
73. Arce E, Jackson DG, Gill MA, et al. Increased frequency of pregerminal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. J Immunol 2001;167: 2361-2369
74. Bohnkorst JO, Bjmgan MB, Thoen JE, et al. Bml- Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell sub-populations in patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol 2001; 167:3610-3618
75. Potter KN, Mockridge CI, Rahman A, et al. Disturbances in peripheral blood B cell sub-populations in autoimmune patients. Lupus 2002; 11:872-877
76. Hansen A, Odenhahl M, Le Reiter K, et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2002;46:12160-2171
77. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. J Immuno1 2000;165:5970-5979
78. Reparon-Schuijt C, van Esch WEJ, van Kooten C, et al. Presence of a population of CD20+ CD38- lymphocytes with defective proliferative responsiveness in the synovial compartment of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:2029-2037
79. Pasare C, Medzhitoo R. Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. Curr Opin Immunol 2003;15:677-682
80. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature 2002;416:603-607
81. Reininger L, Radaszkiewicz T, Kosco M, et al. Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term in vitro proliferating (NZBXNZW) Fl pre-B cells. J Exp Med 1992;176:1343-1353
82. Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP, et al. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZBXNZW) F1 mice. J Exp Med 1996;184:853-861
83. Stevenson FK, Natvig JB. Autoantibodies revealed: the role of B cells in autoimmune disease. Immunol Today 1999;20:296-298
84. Chan OTM, Schlomchik MJ. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-*lpr/lpr* mice. J Immunol 1998;160:51-59
85. Chan OTM, Hannum LG, Haberman AM, et al. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-dependent role for B cells in murine lupus. J Exp Med l999;189:1639-1648
86. Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, et al. B cells are required for the initiation of insulitis and sialitis in nonobese diabetic mice. Diabetes 1997;46:491-496
87. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science 1994;264:703-707
88. Koni P, Sacca R, Lawton P, et al. Distinct role in lymphoid organogenesis for lymphotoxins a and b revealed in lymphotoxin b-deficient mice. Immunity 1997;6:491-500
89. Lehvi M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, et al. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-I signaling. J Exp Med 1996;183:2367-2372
90. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, et al. Immune and inflammatory responses in TNF-a-deficient mice: a critical recruitment for TNF-a in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. J Exp Med 1998;184:1397-1411
91. Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, et al. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice influence B and T cells. J Immunol 1993;150:2648-2658
92. Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, et al. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J Exp Med 1998;187:997-1007.
93. Cemy A, Zinkornagel RM, Groscurth P. Development of follicular dendritic cells in lymph nodes of B cell-depleted mice. Cell Tissue Res 1998;254:449-454
94. Murata K, Ishii N, Takano N, et al. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. J Exp Med 2000;191:365-374
95. Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, et al. CD4 T cell cytokine differentiation : the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin-4 and upregulates expression of the chemokine receptor Bbr-1. J Exp Med 1998;188:297-304
96. Askenase PW, Tsuji RF. B1 B cell IgM antibody initiates T cell elicitation of contact sensitivity. Curr Top Microbiol Immunol 2000;252:171-177
97. Chouaib S, Branellec D, Buurman WA. More insights into the complex physiology of TNF. Immunol Today 1991;12:141-142
98. Gómez D, Correa PA, Gomez LM, et al. Thl/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor-a protective? Semin Arthritis Rheum 2004;33:404-413
99. Schultz KR, Klarnet JP, Gieni RS, et al. The role of B cells for in vivo T cell response to a Friend virus-induced leukemia. Science 1990;249: 921-923
100. Mohan C, Morel L, Yang P, et al. Accumulation of splenic B-1a cell with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. Arthritis Rheum 1998;41:1652-1662

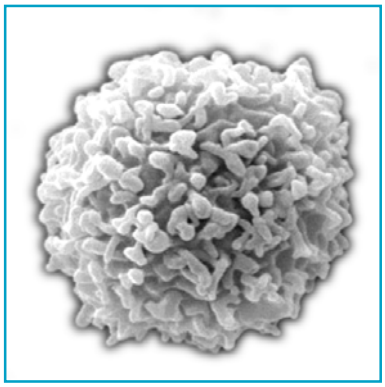
101. Roosnek E, Langevecchia A. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. J Exp Med 1991;173:487-489
102. Edwards JCW, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? Immunology 1999; 97:188-196
103. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, et al. T cell activation in rheumatoid synovium in B cell-dependent. J Immunol 2001;167:4710-4718
104. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells require antigen from target cells after synapse formation. Nature 2001;411:489-494
105. Dustin ML, Dustin LB. The immunological relay race: B cells take antigen by synapse. Native Immunol 2001;2:480-482
106. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, et al. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. J Immunol 1991;147:117-123
107. Nagafuchi H, Suzuki N, Mizushima Y, et al. Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol 1993;151:6525-6534
108. Fiinck BK, Chan B, Wofsy D. Interleukin-6 promotes murine lupus in (NZB/NZW) F1 mice. J Clin Invest 1994;94:585-591
109. Mihara M, Tagaki N, Takeda Y, et al. IL-6 receptor blockade inhibits the onset of autoimmune kidney disease in (NZB/W) F1 mice. Clin Exp Immunol 1998;112:397-402
110. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffinan RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001;19:683-765
111. O'Garra A, Chang R, Go N, et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. Eur J Immunol 1992;22:711-717
112. Ishida H, Hastings R, Kearney J, et al. Continuous interleukin-10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells, but not conventional B cells. J Exp Med 1992;175:1213-1220
113. Peng B, Mehta NH, Fernández H, et al. Growth inhibition of malignant CD5t B (B-1) cells by antisense IL-10 oligonucleotide. Leuk Res 1995;19:159-167
114. Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. J Exp Med 1995;181:839-846
115. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity in autoimmunity. Arthritis Rheum 1994;37: 1647-1655
116. Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, et al. Clinical and biological effects of anti-interleukine-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2003;43: 1790-1800
117. Vink A, Warmer G, Brombacher F, et al. Interleukin 9 induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. J Exp Med 1999;189: 1413-1423
118. Foussat A, Balabanian K, Amara A, et al. Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. Eur J Immunol 2001;31:350-359
119. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Thl, Th2 and more. Immunol Today 1996; 17:138-146
120. Sartoni A, Gri G, Showe L, et al. Interleukin-12: an immunoregulatory cytokine produced by B cells and antigen-presenting cells. J Immunol Methods 1997;ll:116-127
121. Schultze JL, Michalak S, Lowne J, et al. Human non-germinal center B cell interleukin (1L)-12 productions is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. J Exp Med 1999;189:1-12
122. Ohnishi E, Iwata T, Inouye S, et al. Interleukin-4 production in Epstein-Barr virus-transformed B cell lines from peripheral mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. J Interferon Cytokine Res 1997;17: 597-602
123. Kindler V, Matthes T, Jeannin P, et al. Interleukin-2 secretion by human B lymphocytes occurs as a late event and requires additional stimulation after CD40 cross-linking. Eur J Immunol 1995;25:1239-1243
124. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nature Immunol 2000;1:475-482
125. Nosmann T. Complexity or coherence? Cytokine secretion by B cells. Nature Immunol 2000;1:465-466
126. Amel Kashipaz MR, Huggins ML, Lanyon P, et al. Assessment of Be1 and Be2 cells in systemic lupus erythematosus indicates elevated interleukin-10-producing CD5+ B cells. Lupus 2003;12:356-363
127. Mtsuchi L, Gold MR. New views of BCR structure and organization. Curr Opin Immunol 2001;13:270-277
128. Reth M, Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. Annu Rev Immunol 1997;15:453-479
129. Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signalling by lymphocyte antigen receptors. Annu Rev Immunol 1998;16:645-6770
130. Craxton A, Otipoby KL, Jiang A, et al. Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes. Adv Immunol 1999;73:79-152
131. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Gene Dev 1999;13:2905-2927
132. Hsueh RC, Scheuermann RH. Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation and dealth responses initiated from the B cell antigen receptor. Adv Immunol 2000;75:283-316
133. Tarlinton DM, Smith KGC. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. Immunol Today 2000;21:436-441
134. Lam KP, Hiihn R, Rajewsky R. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. Cell 1997;90: 1073-1083
135. Renaudineau Y, Nedellec S, Berthou C, et al. Role of B cell antigen receptor associated molecules and lipid rails in CD5-induced apoptosis of B CLL cells. Leukemia, in press.
136. Nedellec S, Renaudineau Y, Berthou C, et al. B cell response surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. J Immunol, in press.
137. Zouali M, Sarmay G. B lymphocyte signalling pathways is systemic auto- immunity. Implications for pathogenesis and treatment. Arthritis Rheum 2004;50:2730-2741
138. Liossis SMC, Kovacs B, Dennis G, et al. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early transduction events. J Clin Invest 1996;98:2549-2557
139. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med 1994;179: 1317-1330
140. Ferry H, Jones M, Vaux DJ, et al. The cellular location of self-antigen determines the positive and negative selection of autoreactive B cells. J Exp Med 2OO3;l98:1415-1425
141. Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, et al. CD22 is a negative regulator of B cell receptor signaling. Curr Biol 1997;7:133-143
142. Adachi T, Wakabayashi C, Nakayama T, et al. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. J Immunol 2000;164:223-1229
143. Lankester AC, van Schijndel GMW, Cordell JL, et al. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. Eur J Immunol 1994; 24:812-816
144. Jamin C, Le Cone R, Pers JO, et al. Modulation of CD72 by ligation of B cell receptor complex molecules on CD5+ B cells. Int Immunol 1997;9:1001-1009
145. Jamin C, Lamour A, Pennec YL, et al. Expression of CD5 and CD72 on T and B cell subsets in rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 1993;92:245-250
146. Pers JO, Jamin C, Le Cone R, et al. Ligation of CD5 on resting B cells, but not on resting T cells, results in apoptosis. Eur J Immuno1 1998;28:4170-4176
147. Jamin C, Le Corre R, Lydyard PM, et al. Anti-CD5 extends the proliferative response of human CD5+ B cells activated with anti-IgM and interleukin-2. Eur J Immunol 1996;26:57-62
148. Gergely J, Sarmay G. Fcy RII-mediated regulation of human B cells. Scand J Immunol 1996;44:1-10
149. Huck S, Le Corre R, Youinou P, et al. Expression of B cell receptor-associated signaling molecules in human lupus. Autoimmunity 2001; 33:213-224
150. Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, et al. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. Science 1995; 269:242-244
151. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, et al. SHIP recruitment attenuates Fcã RII B-induced B cell apoptosis. Immunity 1999;10:753-760
152. Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity 1999;11:141-151
153. Blasioli J, Goodnow CC. Lyn/CD22/SHP-1 and their importance in autoimmunity. Curr Dir Autoimmun 2002;5:151-160
154. Hathcock KS, Hirano H, Murakami S, et al. CD45 expression by B cells. Expression of different isoforms by subpopulations of activated B cells. J Immunol 1992;149:2286-2294
155. Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, et al. CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. J Exp Med 1997;186:1923-1931
156. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. Immuno1 2000;165: 6635-6643
157. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. J Clin Invest 2002;109:1453-1462
158. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, et al. Polymorphisms of human CD19

gene: possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Genes Immun 2002;3(suppl 1):521-530
159. Borrero M, Clarke SH. Low-affinity anti-Smith antigen B cells are regulated by anergy, as oppose to development arrest or differentiation to B-1. J Immuno1 2002;168:13-21
160. Gian Y, Santiago C, Borrero M, et al. Lupus-specific antiribonucleoprotein B cell tolerance in nonautoimmune mice is maintained by differentiation to B-1 and governed by B cell receptor signaling thresholds. J Immunol 2001;166:2412-2419
161. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. J Exp Med 2000;191:883-889
162. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 1996;381:751-758
163. Gay D, Saunders T, Camper S, et al. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. J Exp Med 1993;177:999-1108
164. Tiegs SL, Russel DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. J Exp Med 1993;177:1009-1020
165. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification and self-tolerance. Immunity 1996;5:505-511
166. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, et al. RAGl and RAG2, adjacent genes that synergistically activate V(D) recombination. Science 1990; 248:1517-1523
167. Hikida M, Mori M, Takai T, et al. Reex-pression of RAGl and RAG2 genes in activated mature mouse B cells. Science 1996;274:2092-2093
168. Han S, Zheng B, Schatz DG, et al. Neoteny in lymphocytes : RAGl and RAG2 expression in germinal center B cells. Science 1996;274: 2094-2097
169. Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. Reexpression of RAGl and RAG2 genes and evidence for secondary rearrangements in human germinal center B lymphocytes. Eur J Immunol 1998;28:3506-3513
170. Meffre E, Papavasiliou F, Cohen P, et al. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. J Exp Med 1998;188:765-772
171. Hillion S, Youinou P, Jamin C. Expression of recombination activating genes in peripheral B cells outside germinal centers is regulated by CD5. J Immunol, in press.
172. Pierce SK. Lipid rafts and B cell activation. Nat Rev Immunol 2002; 2:96-105
173. Cherukuri A, Cheng PC, Sohn HW, et al. The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. Immunity 2001;14:169-179
174. Aman MJ, Tosello-Trampont AC, Ravichandran K. FcãRIIB1/SHIP-mediated inhibitory signalling in B cells involves lipid rafts. J Biol Chem 2001;276:46371-46378
175. Krishnan S, Nambiar MP, Warke VG, et al. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. J Immunol 2004;172:7821-7831
176. Weintraub BC, Jun JE, Bishop AC, et al. Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited intolerant B cells. J Exp Med 2000;191: 1443-1448
177. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. Nat Rev Immunol 2002;2:465-475
178. Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol 2001; 166:6-10
179. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum 2001;44:1313-1319
180. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J Clin Invest 2002;109:59-68
181. Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2003;62:168-174
182. Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, et al. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. J Patho1 2004;202:496-502
183. Szodaray P, Jellestad S, Ohlsson Teague M, et al. Attenuated apoptosis of B cell activating factor-expressing cells in primary Sjögren's syndrome. Lab Invest 2003;83:357-365
184. Kern C, Cornuel JF, Billard C, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. Blood 2004;103:679-688
185. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, et al. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. Blood 2002;100:2973-2979
186. Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. Immunity 2004;20:785-798
187. Hase H, Kanno Y, Kojima M, et al. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. Blood 2004;103:2257-2265
188. Jamin C, Magadur G, Lamour A, et al. Cell-free CD5 in patients with rheumatic diseases. Immunol Lett 1991;31:79-84
189. Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, et al. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford) 2001;40: 1056-1059
190. Calvo J, Places L, Espinosa G, et al. Identification of a natural soluble form of human CD5. Tissue Antigens 1999;54:128-137
191. van de Velde H, Thrilemans K. Native soluble CD5 delivers a costimulatory signal to resting B lymphocytes. Cell Immunol 1996;172:84-91
192. Renaudineau Y, Mageed RA, Youinou P. An alternative exon 1 of human cd5 gene regulates CD5 protein expression. J Immunol, in press.
193. Goryman C, Leandro M, Isenberg DA. Does B cell depletion have a role to play in the treatment of systemic lupus erythematosus? Lupus 2004;13:312-316
194. Pate1 DD. B cell-ablative therapy for the treatment of autoimmune diseases. Arthritis Rheum 2002;46:1984-1985
195. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B therapy. Arthritis Rheum 2003;48:1484-1492
196. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res 2002;4(suppl 3):5233-5242
197. Stohl W. A therapeutic role for BLyS antagonists. Lupus 2004;13:317-322
198. Liu W, Szalai A, Zhao L, et al. Control of spontaneous B lymphocyte autoimmunity with adenovirus-encoded soluble TACI. Arthritis Rheum 2004;50:1884-1896
199. Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. Cell 2000;103:211-225
200. Mamie SN, Astier A, Wang D, Scott Phifer J, Chen J, Lazarovits AI, et al. Stimulation of tyrosine phosphorylation after ligation of B7 and Bl integrins on human B cells. Blood 1996;87:1855-1861

9

LINFOCITOS T EN AUTOINMUNIDAD

Alejandro
Ruiz-Argüelles



Contenido

Linfocitos T
Papel de las células T
Estructura y genética de los receptores
Selección clonal
Tolerancia central
Tolerancia periférica
Mecanismos de ruptura de tolerancia
Funciones efectoras de linfocitos T
Cooperación de linfocitos T en producción de autoanticuerpos
Daño celular por células T

Las células T tienen una función dual en la autoinmunidad que, para fines didácticos, serán revisados en forma independiente: en un extremo, las células T tienen un papel crucial en la generación de las reacciones autoinmunes, cuando fracasan los mecanismos de edición y regulación que mantienen la tolerancia hacia los antígenos propios; en el opuesto, las células T autorreactivas participan como efectoras de las respuestas inmunitarias autodirigidas responsables del daño tisular.

Papel de las células T en la tolerancia inmunológica

El término tolerancia se refiere a la ausencia de respuesta inmunológica hacia moléculas con capacidad de ser antigénicas. La tolerancia puede inducirse en diversas condiciones experimentales y se ha propuesto que los mecanismos responsables de este fenómeno son los mismos que operan en la tolerancia hacia los antígenos propios, fenómeno conocido como autotolerancia. Explicada por Paul Erlich a fines del siglo XIX como la aversión del sistema inmune de ser dañino al organismo propio *-horror autotoxicus-*, hoy se sabe que la tolerancia resulta de procesos activos, en los que las células T desempeñan un papel primordial. La autotolerancia de las células T puede explicarse por tres mecanismos: la deleción clonal, la anergia clonal y la supresión clonal (1-3).

Estructura y genética de los receptores para antígenos de las células T

Para una mejor comprensión de cómo funcionan estos mecanismos, es menester revisar en forma somera la estructura y polimorfismo genético de los receptores antigénicos de las células T. Los receptores para antígenos de las células T están constituidos por heterodímeros formados por dos cadenas, semejantes entre sí, que contienen regiones constantes y regiones variables. La Figura 1 esquematiza la estructura de estos receptores, comúnmente llamados receptores de células T (TCR). Existen cuatro tipos de cadenas en la conformación de los receptores de las células T: las cadenas α que siempre forman dímeros con las β, y las γ que siempre lo hacen con las δ. De manera similar a lo que ocurre con las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, las regiones variables de las cadenas α y γ están codificadas por segmentos V y J en la línea germinal, mientras que para las cadenas β y δ existe un segmento adicional, llamado D, que contribuye a la recombinación. Cada una de las cuatro cadenas involucradas en la conformación de los receptores de células T está

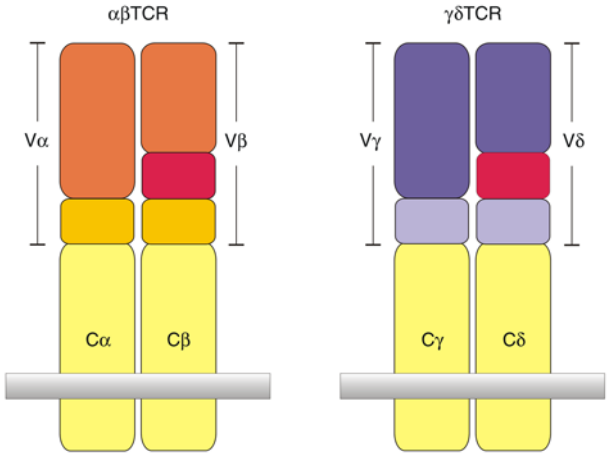


FIGURA 1.
Los receptores para antígenos en las células T están conformados por heterodímeros α y β ó γ y δ. Cada una de estas cadenas está conformada por una región constante (Cα, Cβ, Cγ y Cδ) y una variable (Vα , Vβ, Vγ y Vδ). Las regiones variables de las cadenas α y γ están codificadas en 2 regiones génicas (V y D) mientras que las regiones variables β y δ están codificadas en 3 regiones génicas (V, D y J). Las regiones constantes contienen una porción hidrofóbica responsable del anclaje transmembranal del receptor.

formada por dos dominios, de los cuales uno es variable (Vα, Vβ, Vγ y Vδ) y el otro es constante (Cα, Cβ, Cγ y Cδ). La mayoría de las células T de un adulto sano expresan receptores conformados por las cadenas α y β, llamados αβ TCR, mientras que sólo en una pequeña proporción expresan las cadenas γ y δ (γδ TCR) (4-5).

Se llaman genes de la línea germinal aquellos que se heredan de los progenitores, que están presentes en las células reproductoras, y por ende también en todas las células somáticas del organismo (Tabla 1). Éstos se encuentran divididos en distintos segmentos que, en las células linfoides T, recombinan entre sí para formar las regiones variables de las cadenas que conforman a los TCR (Figuras 2 y 3).

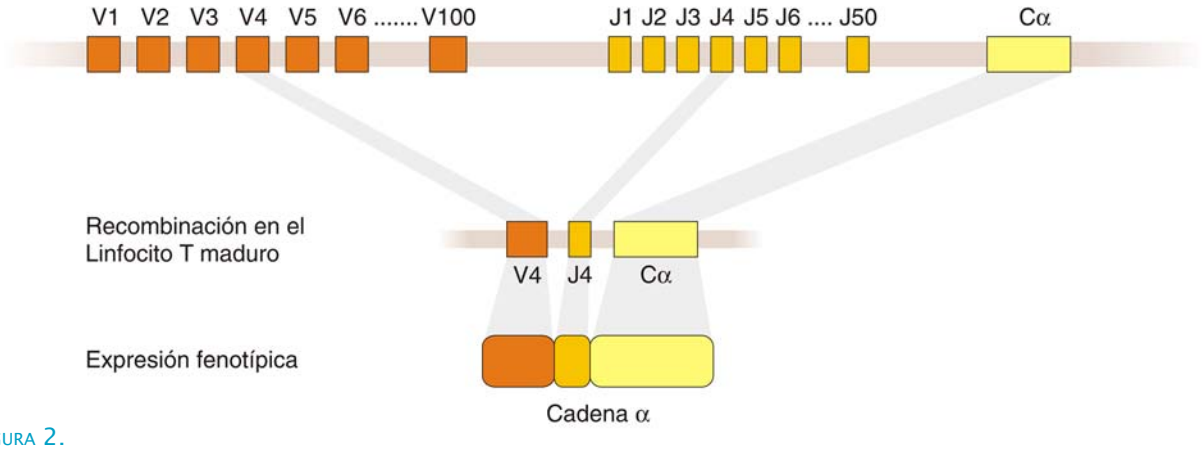


FIGURA 2.
Los genes que codifican la cadena α del αβTCR están ubicados en el cromosoma 14, en tres segmentos de la línea germinal : V, J y C. Cada linfocito maduro hace un "arreglo" con un gene de cada uno de los segmentos V y J, y el gene C, que es único. Esta recombinación es la que finalmente se expresa fenotípicamente en ese clon de linfocitos. La cadena γ del γδTCR utiliza un mecanismo similar.

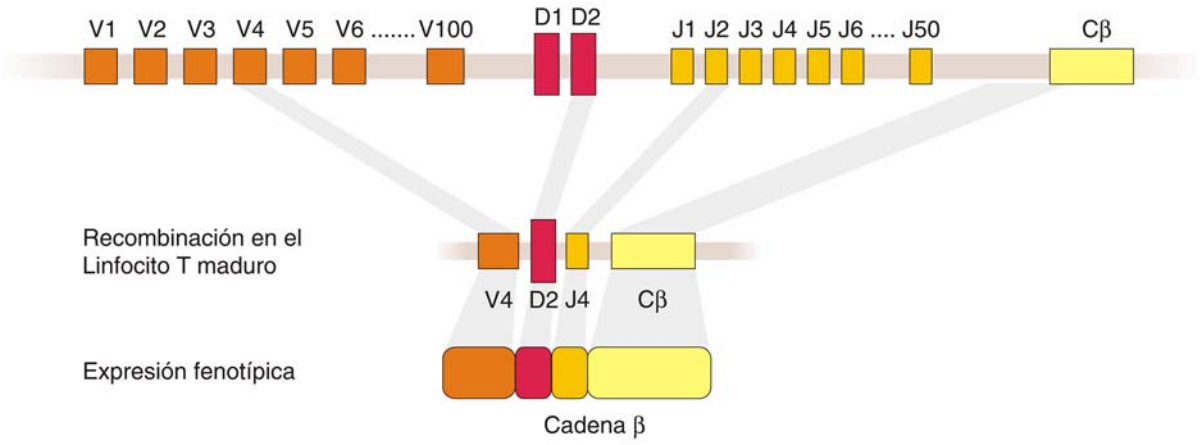


FIGURA 3.
Los genes que codifican la cadena β del αβTCR están ubicados en el cromosoma 7, en cuatro segmentos de la línea germinal: V, D, J y C. Cada linfocito maduro hace un "arreglo" con un gen de cada uno de los segmentos V, D y J, y el gen C, que es único. Esta recombinación es la que finalmente se expresa fenotípicamente en ese clon de linfocitos. La cadena δ del γδTCR utiliza un mecanismo similar.

TABLA 1. Genes de la línea germinal que codifican la región variable de los receptores antigénicos de las células T.

Segmento Genético	TCR Alfa / Beta		TCR Gamma / Delta	
	vα	vβ	vγ	vδ
Variable (V)	100	25	5	10
Diversidad (D)	NO	2	NO	2
Unión (J)	50	12	4	2

En los linfocitos no estimulados por un antígeno, la línea germinal permanece inmutada, por lo que el repertorio "de reposo" del organismo tiene una diversidad relativamente limitada. En los linfocitos estimulados por un antígeno, la diversidad germinal se enriquece mucho por imprecisiones en la recombinación, adición aleatoria de nucleótidos y mutación somática. Estos elementos no hereditarios de la diversidad, puesto que ocurren sólo en las células linfoides, determinan cambios en la afinidad del receptor por su correspondiente antígeno: algunos de ellos aumentan, en tanto que otros disminuyen la afinidad del receptor original. Este proceso, conocido como maduración de la especificidad, tiene importancia central en los mecanismos de mantenimiento de la autotolerancia (4).

Selección clonal

Antes de describir los mecanismos responsables de mantener la autotolerancia, es útil revisar el concepto de la selección clonal. El rearreglo o recombinación de los diversos genes de las regiones variables de los TCR ocurre en ausencia de antígeno; es decir, el repertorio inmunológico, con toda su enorme variabilidad, no se genera cuando ocurre un estímulo antigénico, sino que lo hace en forma totalmente aleatoria. Es así como, un individuo dado tiene muchos miles de receptores para discriminar otros tantos miles de antígenos, antes de siquiera exponerse a alguno de todos ellos. En la vida de ese organismo, es muy probable que la gran mayoría de esos receptores nunca encuentren a su antígeno. De hecho, se ha podido demostrar, en forma experimental, que el repertorio inmunológico de un individuo sano contiene receptores para antígenos inexistentes en la naturaleza. El individuo adulto se expone entonces a un medio ambiente variable e incierto en cuanto a sus determinantes antigénicos, pero suficientemente preparado para discriminar y reaccionar contra todos aquellos antígenos que pudiese "encontrar" durante su vida. Cuando a ese individuo se le presenta un determinante antigénico, es éste el que ha de elegir, entre los miles o millones de receptores, aquel que es óptimamente complementario. La clona que exhibe dicho receptor es así mismo seleccionada, y en consecuencia activada por el antígeno (6).

Un mismo determinante antigénico puede resultar complementario a varios receptores inmunológicos, pero entre todos estos existe uno único, con el que un acoplamiento espacial y fisicoquímico es óptimo, y con el cual se unirá con la mayor afinidad. De manera análoga, un mismo receptor puede reaccionar con diversos determinantes antigénicos fisicoquímicamente semejantes entre sí, aunque lo haga con la máxima afinidad con solo uno de ellos. Por tanto, en el proceso de la selección clonal, es posible que un mismo antígeno seleccione y active a diversas clonas, y también es posible que un receptor, seleccionado y activado por sólo un determinante antigénico, pueda reaccionar con otros determinantes antigénicos semejantes. El primer fenómeno, es decir, la reactividad de varios receptores a un mismo antígeno, se llama reactividad cruzada y es un fenómeno policlonal, pues involucra la activación de varias clonas de células inmunes; en tanto que el segundo, la reactividad de un mismo receptor a varias determinantes antigénicas, se llama polirreactividad y es un proceso monoclonal (7).

Como se indicó anteriormente, existen tres mecanismos principales por los que los linfocitos son tolerantes hacia determinantes antigénicos propios: la deleción clonal, la anergia clonal y la supresión. La primera se re-

fiere a la eliminación física de las clonas autorreactivas del repertorio inmunológico en etapas tempranas de su vida. La anergia clonal, también llamada ignorancia clonal, implica la falta de la activación de las clonas autorreactivas, sin ser necesaria la eliminación física del repertorio. La supresión supone mecanismos de control de la activación y expresión de clonas autorreactivas, a través de la participación de otras células, citoquinas y anticuerpos con actividad inhibitoria. La participación preferencial de uno u otro mecanismo está condicionada por los siguientes factores:

a. El estadio de maduración de la clona autorreactiva.
b. La afinidad de sus receptores por el autoantígeno.
c. La naturaleza del autoantígeno.
d. La concentración del autoantígeno.
e. La distribución tisular del autoantígeno.
f. El patrón de expresión del autoantígeno.
g. La disponibilidad (o falta) de señales coestimuladoras.

Se analizará la participación de estos mecanismos en los dos escenarios en que esto ocurre: en el timo, y en los órganos linfoides secundarios o periféricos (1-7).

Tolerancia central o tímica

Las células T se desarrollan en el timo a partir de precursores comprometidos pero que aún no han rearreglado los genes que codifican para el TCRs. Durante su maduración intratímica ocurren estos rearreglos y la consecuente expresión de los TCRs en su membrana, y por ende, adquieren la capacidad de reconocer y reaccionar ante la presencia de antígenos. La tasa proliferativa de los linfocitos T en el timo es muy alta; sin embargo, una proporción muy importante de todos los linfocitos que se generan mueren dentro del propio microambiente tímico. Son tres los mecanismos por los que una gran proporción de linfocitos T inmaduros mueren en el timo: a) rearreglos genéticos fallidos de las regiones V del TCR, b) selección clonal negativa y c) fracaso de la selección clonal positiva.

El primer mecanismo no requiere comentarios adicionales. La selección clonal negativa es el proceso por el cual las células cuyos TCRs exhiben alta afinidad por péptidos autólogos, incurren en el proceso de apoptosis cuando dichos péptidos le son presentados en el contexto de moléculas autólogas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La selección clonal positiva, responsable final de la edición del repertorio inmunológico funcional, consiste en la supervivencia de aquéllas clonas linfoides cuyos TCRs muestran afinidad moderada por péptidos autólogos, derivados del recambio tisular normal, que les son presentados en el contexto de las regiones polimórficas de un antígeno MHC autólogo: las células T con estas características encuentran a sus correspondientes antígenos en la membrana de las células epiteliales de la corteza tímica, y por consiguiente no incurren en el proceso de apoptosis. Este proceso de selección positiva asegura que las células supervivientes que forman parte del repertorio funcional, sean capaces de reconocer, con baja o moderada afinidad, sólo a péptidos autólogos unidos a la hendidura de moléculas MHC autólogas y, por lo tanto, sean restringidas al MHC (5-9).

Debido a que los dos mecanismos de selección, positiva y negativa, involucran el reconocimiento de péptidos autólogos presentados en el contexto de moléculas MHC autólogas, parecería contradictorio que señales iniciadas por la misma molécula, el TCR, resulten en efectos exactamente opuestos. Existen dos teorías para explicar esta aparente contrariedad: la teoría cuantitativa defiende que cuando la cantidad de complejos péptido autólogo/MHC autólogo que se presentan es baja, se produce la selección positiva, en tanto que la selección negativa se da cuando la cantidad de esos complejos moleculares es alta. Por su parte, la teoría cualitativa supone que es la estructura molecular del complejo péptido/MHC, y no su densidad, la que determina que ocurra selección clonal positiva o negativa. Es prudente enfatizar que estas teorías no son excluyentes, y por tanto es posible que ambas características, cantidad y calidad, de los péptidos autólogos presentados al TCR, influyan en el destino de muerte o supervivencia de las células T (1-4).

El estadío de maduración de las células T durante el proceso de selección clonal se caracteriza por la presencia en su superficie de las moléculas CD4 y CD8 en forma simultánea. Estas moléculas, que después definen poblaciones de células maduras con distintas funciones, son coreceptores del TCR en el reconocimiento de moléculas de clase II y I, respectivamente, en la membrana de las células presentadoras de antígeno (CPA). En el momento justo de la selección clonal en el timo, las células positivas para ambas moléculas (CD4+ / CD8+), dejan de expresar una de ellas y a partir de entonces se comprometen a llevar a cabo funciones citotóxicas (CD4- / CD8+) o cooperadoras (CD4+ / CD8-). La Figura 4 esquematiza los eventos de selección y edición del repertorio inmune dentro del timo.

Tolerancia periférica o post-tímica

Algunas clonas autorreactivas escapan a los mecanismos editores del timo y pueden encontrarse en el contexto periférico de linfocitos. Las razones que explican el por qué estos linfocitos autorreactivos no son eliminados en el timo son diversas:

a. No todos los autoantígenos se expresan y presentan en el timo.
b. No todos los péptidos autólogos presentes en el timo son capaces de unirse establemente a moléculas MHC dentro del timo.
c. No todos los TCR se unen a sus correspondientes péptidos autólogos con la afinidad necesaria para la selección negativa.

El sistema dispone de cuatro mecanismos altamente eficaces para evitar que las clonas autorreactivas que escapan del proceso de eliminación intratímico puedan producir daño a células o tejidos propios (tolerancia periférica) son: *la ignorancia*, *la anergia*, *la muerte celular* y *la supresión* o *desviación de su reactividad*.

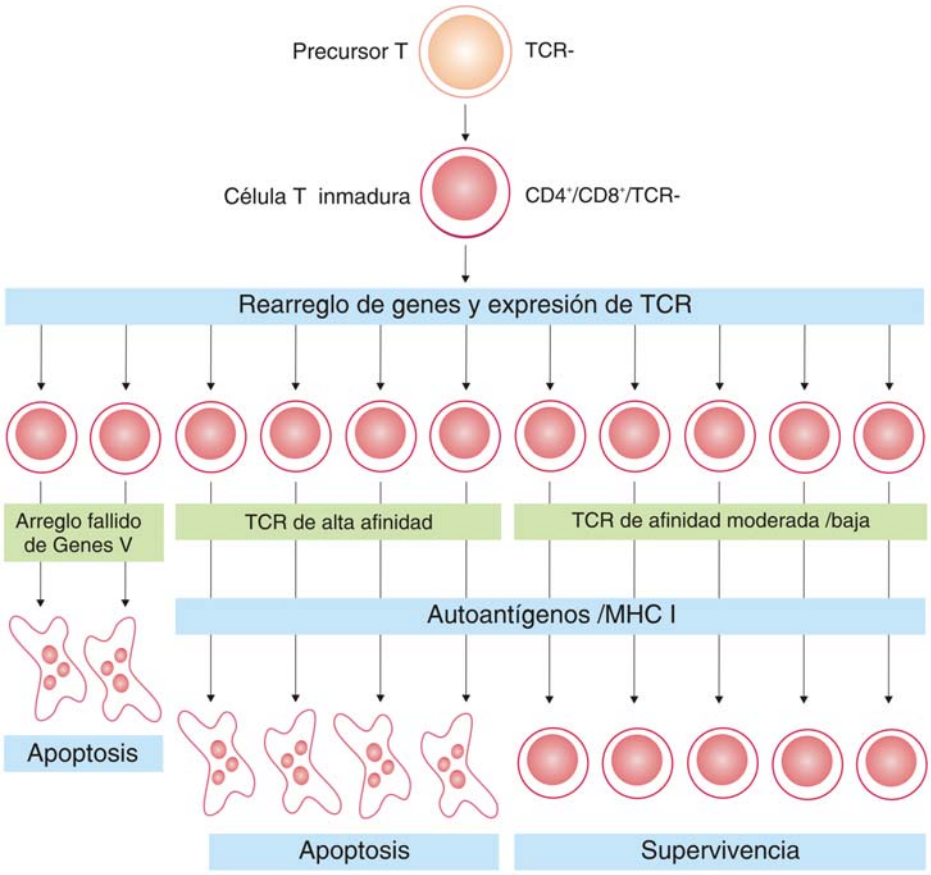


Figura 4.
En la maduración intratímica de los linfocitos T ocurren diversos procesos de selección. Cuando los linfocitos T inmaduros comienzan a rearreglar y expresar moléculas TCR. Algunos no logran construir receptores funcionales e incurren en muerte por apoptosis. De aquellos que sí lo consiguen, los que expresan receptores de muy alta afinidad por autoantígenos, mueren por apoptosis cuando entran en contacto con ellos (selección negativa). Los restantes, que tienen moderada o baja afinidad por autoantígenos, sobreviven para formar parte del repertorio activo de los linfocitos T en la vida adulta (selección positiva).

La ignorancia es una forma de tolerancia inmunológica pasiva que ocurre cuando se da una de las siguientes circunstancias:

a. Las células T autorreactivas no tienen acceso a sus correspondientes autoantígenos, porque estos están secuestrados por una barrera anatómica.
b. Las células T autorreactivas, a pesar de tener acceso a sus autoantígenos, no se activan dado que:
   - El autoantígeno está en una concentración demasiado baja.
   - El autoantígeno es presentado por células que expresan, si acaso, muy pocas moléculas MHC.
   - La cantidad de células T en el tejido es muy escasa.
   - El antígeno es presentado en ausencia de señales coestimuladoras.

Se denominan señales coestimuladoras a las interacciones moleculares secundarias, adicionales a la unión del TCR con el complejo MHC/péptido, sin cuya participación no ocurre la activación de las células T, aun cuando la interacción entre el TCR y el complejo MHC/péptido (densidad y afinidad) sea óptima. De ellas, quizás la más importante es la interacción de la molécula B7 en la célula presentadora del antígeno, con la molécula CD28 en la membrana de la célula T (7-9) (Capítulo 6).

La anergia, ha sido definida como "*un estado celular en el que un linfocito está vivo pero es incapaz de tener algunas respuestas funcionales cuando es estimulado óptimamente, a través tanto de su receptor para antígenos como de las señales coestimuladoras requeridas para la activación*". El fenómeno puede reproducirse *in vitro* si se estimulan células T con su antígeno específico, pero no se provee la coestimulación a través de CD28/B7, y este estado puede revertirse al adicionar interleuquina-2 (IL-2). Es muy improbable que este estado de anergia, su reversibilidad, operen *in vivo* como un mecanismo responsable de mantener la tolerancia (puesto que cualquier condición en la que se produjera IL-2 sería capaz de desencadenar procesos autoinmunes). Es plausible la hipótesis de que el estado de anergia secundario a la ausencia de señales coestimuladoras fuese un factor adicional, quizás momentáneo, que participe en mantener el balance entre autotolerancia y autoinmunidad.

La *muerte celular* extratímica parece tener importancia en el mantenimiento de la autotolerancia. En la actualidad se conoce con certeza que una gran cantidad de las células T maduras incurren en apoptosis al establecer contacto con su correspondiente antígeno en los órganos linfoides periféricos. Este mecanismo parece ser fundamental no sólo para mantener la tolerancia hacia antígenos autólogos, sino para limitar la clona de linfocitos reactivos hacia cualquier antígeno. La muerte celular periférica postímica, implica la interacción del receptor Fas, también llamado Apo-1 o CD95, con su ligando correspondiente FasL; o alternativamente, del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) con dicho factor (TNF). Estas interacciones, que ocurren en la superficie externa de la membrana de la célula T, inducen la activación de proteasas parecidas a la enzima convertidora de IL-1β, genéricamente conocidas como proteasas ICE, que disparan

una cascada de eventos proteolíticos que terminan en la muerte celular programada o apoptosis. Las células que incurren en este proceso, aumentan la expresión de moléculas de FasL en su superficie, que por interacciones con receptores Fas de células T vecinas, inducen su muerte en un fenómeno conocido como fratricidio (6-9).

La molécula CTLA-4 tiene también un papel importante en el proceso de muerte celular post tímica. Bajo ciertas condiciones, las células T activadas expresan mayor proporción de moléculas CTLA-4 que de CD28; ambas moléculas, CTLA-4 y CD28, son capaces de reaccionar con la molécula B7, presente en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre como resultado de la interacción de B7 con CD28, que constituye una segunda señal para la activación de las células T por el antígeno, la unión de CTLA-4 con B7 determina un bloqueo de la síntesis de IL-2, la detención del ciclo celular y eventualmente la muerte celular por apoptosis (Capítulo 15). De esta forma, la coestimulación a través de B7 puede tener dos destinos opuestos, cuyo balance final determinará la magnitud de la activación clonal de las células T.

Como *desviación inmune* se conoce al estado de tolerancia que ocurre en un organismo hacia un antígeno dado, cuando éste es previa o simultáneamente desafiado con otro antígeno, con estructura semejante o físicamente asociado, al primero. Esta tolerancia por "competencia" supone que deben existir otros mecanismos de tolerancia que no implican la muerte o deleción clonal. Uno de los mecanismos más plausibles para explicarla radica en el hecho de que no todas las células T cooperadoras producen las mismas citoquinas y, por tanto, tampoco los mismos efectos. Se conoce la existencia de por lo menos dos subpoblaciones de células T cooperadoras (Th) con funciones efectoras diferentes y excluyentes entre sí: las células Th1, que producen citoquinas con efectos proinflamatorios y citotóxicos, y las células Th2, cuya función principal es colaborar con la producción de anticuerpos y la conmutación de isotipo. Además, unas y otras células se inhiben en forma recíproca, de modo que es válido afirmar que otra función de las células Th1 es inhibir la síntesis de anticuerpos de ciertos isotipos, a la vez que las células Th2 pueden ser consideradas como antiinflamatorias. En lo referente a los mecanismos de mantenimiento de la tolerancia, es posible que el predominio funcional de una u otra subpoblación de células T cooperadoras determine la capacidad e intensidad de respuesta a ciertos antígenos autólogos. En modelos animales de autoinmunidad, mediados en su mayoría por células Th1, es posible regular, mediante la administración experimental de células Th2 isogénicas activadas, la reactividad contra antígenos autólogos. Para finalizar, debe destacarse que la desviación inmune está determinada en gran parte por factores genéticos. De manera que, la administración de un mismo antígeno, en la misma dosis y por la misma vía, en dos animales genéticamente distintos, es capaz de desencadenar una reacción netamente inflamatoria en uno de ellos, mientras que en el otro la reacción puede ser predominante o exclusivamente a través de las síntesis y secreción de anticuerpos (12-14).

En los seres humanos, se ha probado que existe susceptibilidad genética para responder con predominio de uno de estos subtipos celulares ante los mismos estímulos antigénicos bacterianos o parasitarios, lo que además, puede definir la eficacia de la respuesta, la gravedad de la infección y el cuadro clínico. Como ejemplo muy demostrativo, cabe citar la lepra lepromatosa, forma diseminada y más grave de la infección por *M leprae*, que se caracteriza por anergia cutánea y predominio de la función de las células Th2; y contrarestada con la forma tuberculoide, forma localizada de la infección por la misma bacteria, donde predominan las respuestas del tipo Th1.

Mecanismos de ruptura de la tolerancia en el humano

Las enfermedades autoinmunes (EAI) en los seres humanos suelen instalarse en forma insidiosa, por lo que es muy difícil identificar e implicar un evento desencadenante. Es claro que factores genéticos y hormonales son definitivos en la fisiopatología de las EAI, pero es muy probable que existan factores ambientales que disparen los eventos iniciales de las mismas. Existen datos que favorecen la administración de algunos medicamentos y la exposición a ciertos agentes físicos como posibles desencadenantes, aunque en la inmensa mayoría de los pacientes no existen estos antecedentes. Por analogía con lo que sucede en modelos experimentales, y por extensión de lo que parece suceder en algunas EAI, se ha propuesto que un evento infeccioso sea el desencadenante más común de estos padecimientos.

Funciones efectoras de los linfocitos T en autoinmunidad

Para fines exclusivamente didácticos, podría afirmarse que las lesiones tisulares o celulares que caracterizan a las enfermedades por autoinmunidad se agrupan en aquéllas producidas por anticuerpos y las que lo son por células, y en ambas instancias participan activamente las células T. En el primer caso, la mayoría de los autoantígenos son proteicos y por lo mismo, su producción suele requerir del concurso de las células Th2. En el segundo, los linfocitos T específicos de antígenos son responsables de las lesiones titulares. Hay ejemplos de enfermedades humanas en las que esta situación es muy clara, como la anemia hemolítica autoinmune en la que la destrucción temprana de eritrocitos está mediada por anticuerpos circulantes, mientras que en la esclerosis múltiple el daño celular es mediado por células T. Cabe mencionar que la especificidad de los autoanticuerpos que caracterizan diversas EAI es fácil de establecer, pues existen métodos muy sencillos para analizar los determinantes antigénicos con que las moléculas solubles de anticuerpos reaccionan. En el caso de las células T, la tarea es técnicamente mucho más complicada y, en consecuencia, se conoce con mucha me-

nor certeza la especificidad antigénica de las células T autorreactivas.

Cooperación de los linfocitos T en la producción de autoanticuerpos

Dado que no es el objetivo de este capítulo revisar los mecanismos de cooperación entre las células T y las B en la producción de anticuerpos, se mencionarán sus eventos más importantes de forma somera. La diferencia más notable en el reconocimiento de un antígeno por la célula T y por la célula B, radica en que la primera, a través del TCR, sólo puede reconocer un péptido procesado y presentado en el contexto de una molécula del MHC clase II por una CPA. Mientras que la célula B, a través de una molécula de IgM en su membrana, puede reconocer un epítope "nativo" o "silvestre" en la estructura del antígeno no procesado. De esta manera, las células T y las células B "ven" al antígeno desde una perspectiva distinta y bajo estas circunstancias se da la colaboración necesaria para que las células B se expandan, maduren hacia células plasmáticas, produzcan y secreten anticuerpos dirigidos en contra de los determinantes antigénicos que reconocen a través de sus receptores. Entonces, en el caso de la colaboración para la producción de autoanticuerpos, las células T involucradas en el binomio de cooperación T-B, no reconocen al mismo epítope contra el cual están dirigidos los anticuerpos (10-13).

Resulta entonces evidente que, una misma célula B puede recibir la ayuda de diversas células T reactivas a diferentes péptidos antigénicos, siempre y cuando cada una de esas células T haya sido activada por otras CPA mediante la presentación del péptido correspondiente. En resumen, la cooperación de las células T y B para la producción de anticuerpos implica dos procesos bien definidos:

a. La interacción del antígeno "nativo" con el receptor antigénico de la célula B (IgM de membrana).
b. Las señales estimuladoras de las células Th, activadas por un péptido, a través de las moléculas de clase II del MHC en la superficie de las CPA.
c. Las células B, además, son capaces de actuar como CPA y, determinan de esta manera, que su interacción con las células T sea un proceso bidireccional, en el que las primeras presentan al antígeno a las últimas, suministran señales necesarias para la proliferación y diferenciación en células productoras de anticuerpos. En el terreno de las EAI, puede citarse el ejemplo de la producción de anticuerpos contra histonas. La célula B es capaz de reconocer una molécula completa de histona, quizás hasta el nucleosoma íntegro, internalizarla, procesarla, y presentar un péptido derivado de esa histona a una célula T específica para ese determinado péptido. La célula T así activada, puede colaborar con las células B que reconocen la histona completa, a través de otro epítope, para la producción de anticuerpos antihistona. La especificidad de estos anticuerpos no necesariamente será la misma que la del TCR de las células que colaboró en su síntesis y secreción. La Figura 5 esquematiza este ejemplo.

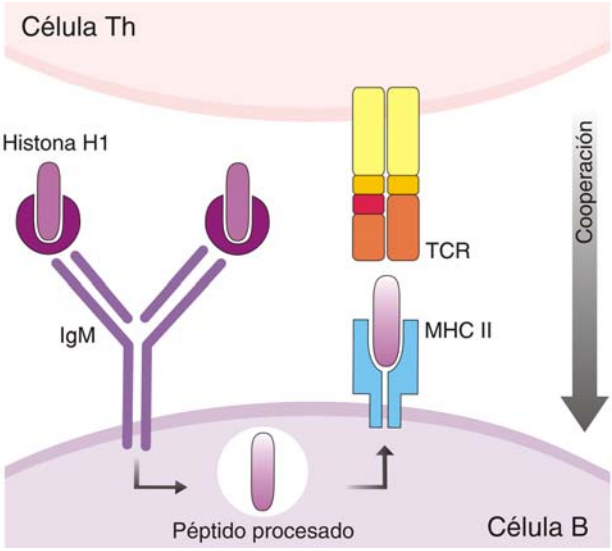


FIGURA 5.
El receptor para antígenos de las células B, constituido por una molécula de inmunoglobulina anclada en la membrana (IgM), a diferencia de los TCR, puede reconocer antígenos complejos, no procesados, y de distinta naturaleza bioquímica. Los antígenos complejos (ej. un nucleosoma) reconocidos por este receptor, pueden internalizarse y procesarse en la célula B, que puede presentar un péptido (ej. un fragmento de la histona H1), en el contexto de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a una célula T cuyo TCR sea específico para ese péptido. La célula T así estimulada provee señales de cooperación a la célula B para su activación, proliferación, síntesis y secreción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ir dirigidos contra determinantes presentes en el antígeno complejo, distintas a las que reconoció el TCR de la célula T cooperadora.

Luego de la interacción que ocurre entre el complejo TCR y el péptido procesado en una molécula de clase II del MHC, se requieren de señales accesorias coestimuladoras, comparables a las que ocurren entre las CPA y las células T cooperadoras. Una vía más de señalización en la activación de las células B es la interacción entre el receptor CD40 con su respectivo ligando (CD40L), que se expresa en forma transitoria en la superficie de las células T cuando éstas son activadas. La interacción de CD40 con CD40L no sólo induce la progresión del ciclo celular en las células B, sino que participa en su maduración y en el intercambio de isotipo de las respuestas secundarias (12-16).

Algunas células B son también capaces de producir citoquinas, como IL-1 e IL-6, que refuerzan la activación de las células T al inducir la expresión de receptores para IL-2, lo que constituye un estímulo adicional para las células T preactivadas por las citoquinas producidas por las CPA. Recíprocamente, algunas citoquinas producidas por las células T, como la IL-2, que induce la proliferación de las células B, la IL-4 y la IL-5, que son activadoras de las mismas, y la IL-6, que participa en su diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos, partici-

pan activamente en el proceso de colaboración entre las células T y las células B. En distintas EAI, se han demostrado alteraciones en las redes de citoquinas que podrían explicar la exhuberancia en la producción de autoanticuerpos.

Daño celular o tisular causado por células T

Las células T activadas, específicas para péptidos autólogos presentados en moléculas MHC autólogas, pueden causar inflamación a través de la activación de macrófagos, o causar daño tisular en forma directa. Los padecimientos en los que esta acción directa de las células T parece ser importante son la diabetes mellitus dependiente de insulina (Tipo I), la artritis reumatoide, algunas formas de tiroiditis autoinmune y la esclerosis múltiple. En estos pacientes, los órganos y tejidos afectados muestran infiltrados abundantes de linfocitos T activados y algunos macrófagos.

A diferencia de lo que ocurre con las EAI producidas por autoanticuerpos, no es posible reproducir la enfermedad autoinmune en animales experimentales mediante la transferencia de células T, puesto que las funciones efectoras de las células T están restringidas al MHC. A pesar de estas limitaciones, hay evidencias contundentes de la participación directa de las células T en los mecanismos de daño que operan en las EAI. En la diabetes tipo I, las células β de los islotes pancreáticos son destruidas selectivamente por células T citotóxicas específicas. Cuando estos pacientes son trasplantados con segmentos del páncreas de un gemelo idéntico, las células β del injerto son rápida y selectivamente destruidas por células T citotóxicas CD8+. Además, inmunosupresores como la ciclosporina A y otros potentes inhibidores de las células T son de gran utilidad en el tratamiento de estos pacientes. Sobra decir que las células T CD4+ reactivas a los antígenos de las células β del páncreas, participan de forma paralela en la cooperación para la producción de los autoanticuerpos que se demuestran en estos pacientes contra estas mismas células, y que muy probablemente, también juegan un importante papel patogénico.

Los modelos experimentales de enfermedad autoinmune están aportando muchas respuestas para el entendimiento de las EAI del humano. Un claro ejemplo de estos modelos es el de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), que ha permitido no sólo conocer con detalle el determinante antigénico contra el que se dirigen las respuestas autoinmunes, sino el repertorio de células T que han roto su tolerancia. En este modelo, se ha probado la existencia de una variedad de células T capaces de proteger a los animales de la EAE en condiciones normales y otra que tiene la potencialidad de causar la enfermedad. Ambas son capaces también de mediar respuestas contra antígenos exógenos, y del balance y sintonía de cada una de ellas, parece depender la expresión de la enfermedad o el mantenimiento del estado de salud (17).

En resumen, los linfocitos T juegan una función importante en el desarrollo de las EAI, por ser los elementos primordiales responsables del mantenimiento de la autotolerancia; pero además participan en forma activa en los mecanismos efectores causantes del daño celular y tisular de las enfermedades por autoinmunidad. Las dificultades para el análisis de la especificidad de las células T autorreactivas, impiden vislumbrar la posibilidad de su manipulación terapéutica a corto plazo; empero, el empleo de modelos experimentales de autoinmunidad y la manipulación genética de estos animales, cambiará pronto nuestra comprensión de los mecanismos íntimos de las EAI y posiblemente nos brindará la oportunidad de intervenirlos.

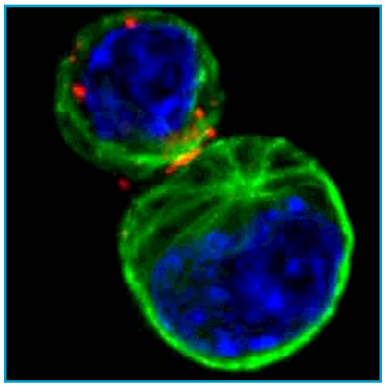
Referencias

1. Manfred Brig., Michael B. Brenner. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. Annu Rev Immunol 2004; 22:817–90
2. Danchin E, Vitiello V, Vienne A, et al. The major histocompatibility complex origin Immunological Reviews 2004; 198: 216–232
3. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Philadelphia PA: Saunders Co, 2002
4. Urban RG, Chicz RM. MHC molecules, expression, Assembly and function. New York, NY. Chapman and Hall. 1996
5. Klein J, Sato A. The HLA system, first of two parts. N Eng J Med 2000; 343:702-709
6. Klein J, Sato A. The HLA system, Second of two parts. N Eng J Med 2000; 343:782-786
7. Geraghty DE, Daza R, Williams LM, et al. Genetics of the immune esponse:identifying immune variation within the MHC and throughout the genome Immunological Reviews 2002; 190: 69–85
8. Hennecke J, Wiley DC. Structure of a Complex of the Human T Cell Receptor (TCR) HA1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class II Molecule, HLA-DR4 (DRA 0101 and DRB1*0401): Insight into TCR Cross-Restriction and Alloreactivity. J Exp Med 2002;195: 571–581
9. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. Tissue Antigens 2004: 64: 631–649
10. Boss JM, Jensen PE. Trascripcional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. Current Opinion Immunol 2003; 15:105-111
11. Kaer LV. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and Presentation Tissue Antigens 2002 60: 1–9
12. Lehner PJ, Cresswell P Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation Current Opinion in Immunology 2004, 16:82–89
13. Ramirez MC, Sigal LJ. The multiple routes of MHC-I cross-presentation TRENDS in Microbiology 2004; 12:204-207
14. Ackerman AL. Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous Antigen. Nature Immunol 2004;5:678-684
15. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan ICM. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. Nature 1989;342: 929-931.
16. Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. Annu Rev Immunol 2000;18: 393-422
17. Anderson AC, Waldner H, MUnder M, Bettelli E, Nicholson LB. T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): Role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenetic T cell repertoire. Ann Rev Immunol 2002; 20: 101-124

10

COSEÑALIZACIÓN EN AUTOINMUNIDAD: CÉLULAS T REGULADORAS, CTLA-4 Y FOXP3

Luis Miguel Gómez
Javier Martín
Carlos A. Cañas D.
Juan-Manuel Anaya



Las moléculas de coseñalización pueden ser divididas en coestimuladoras y co-inhibidoras, las cuales promueven o suprimen la activación celular T, respectivamente. En el tiempo y ubicación precisa, las moléculas de coseñalización controlan la presentación antigénica, crecimiento, diferenciación y función de linfocitos T. De acuerdo con esto, existe un grupo de células que juegan un papel clave en la regulación de la coestimulación: las células T reguladoras. Su aplicación clínica puede ir desde transferencia de estas células en pacientes trasplantados o con enfermedades autoinmunes hasta supresión de las mismas en cáncer. Los mecanismos por los cuales actúan las células T reguladoras son a través de moléculas como CTLA-4, que tiene la capacidad de inhibir la coestimulación y frenar la respuesta de los linfocitos T. Recientemente se han desarrollado medicamentos basados en CTLA-4 que tienen la capacidad de bloquear la presentación antigénica de autoantígenos.

El factor de transcripción FOXP3, es una molécula específica de Treg la cual inhibe la producción de IL-2 en células CD4+ activadas. Actualmente se está tratando de conocer más las funciones de este factor de transcripción para en un futuro desarrollar estrategias terapéuticas. Este capítulo revisa algunos aspectos de la coseñalización y sus mecanismos de acción en las Treg como CTLA-4 y FOXP3, además del papel en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

Contenido

Co-señalización
Células T reguladoras
FOXP3
CTLA-4

Introducción

Las moléculas de coseñalización son glicoproteínas esenciales para la comunicación de las linfocitos T con las demás células del sistema inmune. Durante el contacto célula-célula, el reconocimiento específico ocurre entre moléculas de coseñalización, las cuales desencadenan cascadas de transcripción y expresión de genes claves de la respuesta inmune. Dichas moléculas dependen de las señales del receptor de célula T (TCR) (1). En ausencia de señales del TCR, las moléculas de coseñalización no pueden actuar o lo hacen de manera errónea (2).

La mayoría de moléculas de coseñalización son miembros de las superfamilias de las inmunoglobulinas y del factor de necrosis tumoral (TNF). Además, son considerados factores fundamentales de la sinapsis inmunológica (ver Capítulo 12). En forma práctica, estas moléculas pueden ser clasificadas como coestimuladoras y coinhibidoras, las cuales promueven o inhiben la activación celular T, respectivamente. También se pueden catalogar según su naturaleza funcional, ya sea en receptores o ligandos, para distinguir la dirección de la transmisión de la señal. Esta clasificación puede tener excepciones, ya que un ligando puede ser coestimulador o coinhibidor dependiendo del receptor con el cual interactúe, además un ligando se puede volver receptor si recibe una molécula de coestimulación o coinhibición, un mecanismo conocido como "señal reversa". Dicho mecanismo ha sido descrito entre moléculas B7-H1 y CD80/CD86, y su importancia radica en el mecanismo de regulación de las interacciones entre la célula presentadora de antígeno (CPA) y el TCR (3) (Figura 1).

Células T reguladoras

La evidencia experimental para la existencia de células T con actividad inhibitoria autoinmune ha sido sugerida en varios modelos animales de enfermedades autoinmunes. La timectomía neonatal en ratas, por ejemplo, lleva al desarrollo de enfermedad autoinmune que incluye gastritis, tiroiditis, y ooforitis (4). La timectomía en ratones adultos produce tiroiditis y diabetes autoinmune (5). En estos últimos estudios animales la aplicación de linfocitos T CD4+ histocompatibles, previene el desarrollo de la diabetes autoinmune (6). Estos hallazgos sugieren que existen células T CD4+ capaces de regular la respuesta inmune.

Sakaguchi et al., en 1995, describieron que una subpoblación de células T CD4+ que coexpresaban CD25 (cadena α del receptor de la interleuquina 2) jugaban un papel importante en la función reguladora para el desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelos animales (7). Actualmente estas células se conocen como células T reguladoras (Treg). La manera más característica de diferenciar las Treg es precisamente por la expresión constitutiva de CD25, aunque pueden expresar otros marcadores de superficie como CD134 (OX 40), GITR (receptor del TNF inducido por glucocorticoides o TNFRSF18), CD103, galectina, CTLA-4 y más recientemente neurofilina-1, entre otras(8,9,10). La neurofilina-1 es una molécula que ha despertado curiosidad entre diversos investigadores porque hasta el momento parece ser específica de Treg (10) (Figura 2).

El desarrollo de las Treg se da principalmente en el timo, y un grupo más pequeño en la periferia. La selección positiva y negativa son eventos que se realizan en el

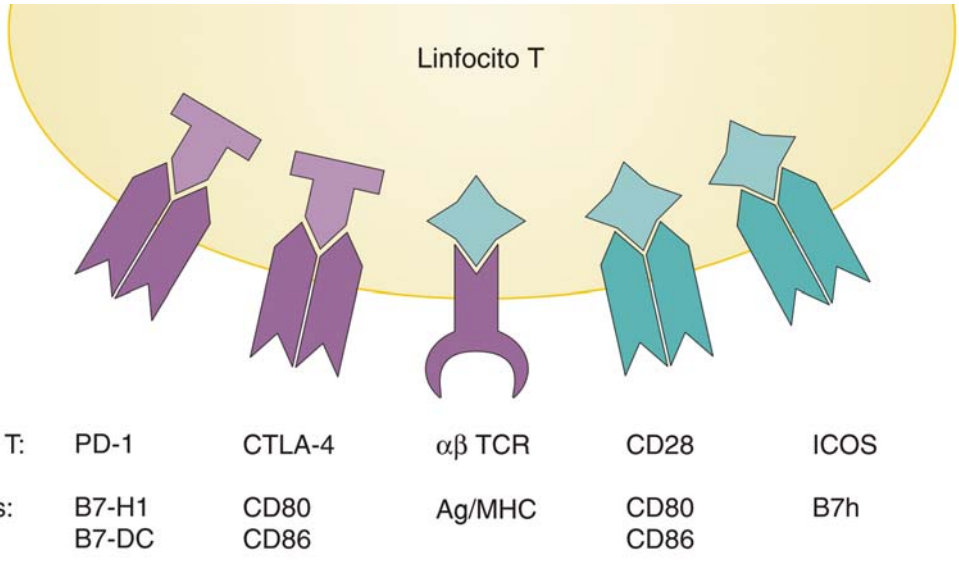


Figura 1.
Moléculas de coseñalización.
Los receptores de superficie de las células T que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas incluyen CD28, ICOS, CTLA-4, y PD-1. CD28 e ICOS transmiten señales de coestimulación positivas, mientras que CTLA-4 y PD-1 transmiten señales de co-inhibición o coestimulación negativas a las células T. CD28 es expresado constitutivamente , mientras que CTLA-4 y PD-1 son expresados después de la activación del linfocito T. CTLA-4 y CD28 comparten dos ligandos , CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). En fases tempranas de la respuesta inmune mediada por las células T, CD28 se une preferencialmente a B7-2 y por lo tanto se da la señal de coestimulación positiva. Posteriormente, cuando CTLA-4 es expresado en la superficie celular, compite con CD28 para unirse a B7-1 ó B7-2, por lo tanto la activación celular T podría tomar un camino de inhibición. Ag: antígeno; MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

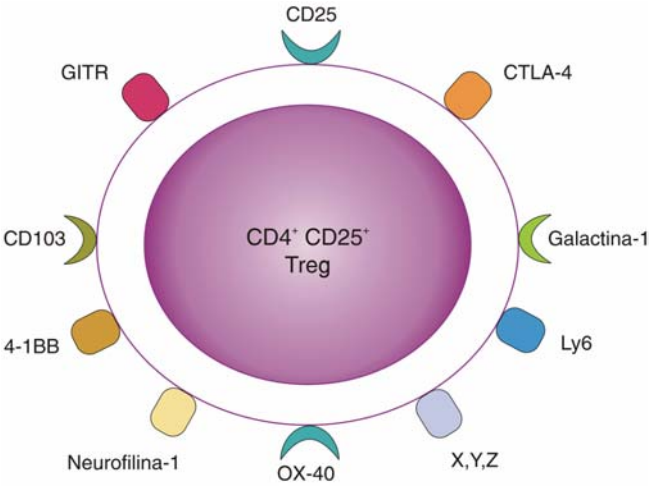


FIGURA 2.
Moléculas de superficie de Treg $CD4^+CD25^+$.
Varios estudios han reportado diferentes moléculas expresadas, preferencialmente, en la superficie de Treg naturales. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores de superficie, no permanecen después de la activación del linfocito T. La moléculas denominada (X, Y, Z) está aún por definir. Estos marcadores, se pueden expresar en células T $CD4^+CD25^-$.

timo, sin embargo, reportes recientes han indicado una tercera función, la generación de las Treg CD4+CD25+. Con la selección positiva se garantiza que los linfocitos T con un TCR funcional (capaz de interactuar con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad-MHC) se desarrollen. Con la selección negativa, se logra eliminar por medio de la inducción de apoptosis, los linfocitos T con un TCR de alta afinidad por el complejo molécula MHC- péptido, previniendo que estas células T entren a la periferia y causen enfermedades autoinmunes (Figura 3).

Las células T expresan TCRs de baja afinidad pero el péptido no sufre selección en la vía supresora, lo cual indica que la especificidad del TCR para autoantígenos está involucrada en la selección de timocitos reguladores CD4+CD25+ por un proceso diferente de la selección positiva y la deleción (11,12). Las Treg pueden reconocer autoantígenos y de ahí su importancia en la prevención de daños generados por linfocitos T autorreactivos en enfermedades autoinmunes.

Las Treg pueden ser diferenciadas de varias maneras pero sus características compartidas con otras células del sistema inmune hace difícil su clasificación. No obstante, se han definido claramente dos tipos de células Tregs: naturales e inducidas (Tabla 1).

Las "Treg naturales" son CD4+CD25+ y son producidas en el timo como una subpoblación de linfocitos T (13). Este subgrupo también está presente en la periferia en estado virgen, denominándose "Treg intrínsecas". Cuando son estimuladas por su TCR, las Treg no proliferan, siendo su mecanismo de acción sobre la represión de las células T efectoras a través del contacto celular (14-16).

Las "Treg inducidas" son de varios tipos. Las que se originan de células CD4+ vírgenes y son inducidas en la periferia, son llamadas Th3 o Tr1. La proliferación de las anteriores es el resultado de la exposición al antígeno en presencia de IL-10 y/o TGF-β. Algunos clones de células T generados en presencia de IL-10, o por el contacto con células dendríticas inmaduras o células tumorales, producen un perfil de citoquinas diferente a los clásicos Th1/Th2, como IL-5, IL-10, TGF-β e IFNγ, pero nunca producen IL-2 o IL-4 (17-20).

Los mecanismos de acción de las Treg intrínsecas CD4+ CD25+ se desconoce en su mayoría. Estudios *in vitro*, han mostrado inhibición de respuestas proliferativas de linfocitos T CD4+ y CD8+, por mecanismos diferentes que son independientes del TGF-β y de IL-10 (15,16). Posteriormente se demostró que el bloqueo de CTLA-4 o de CD25 no inhibe la actividad supresora de estas células.

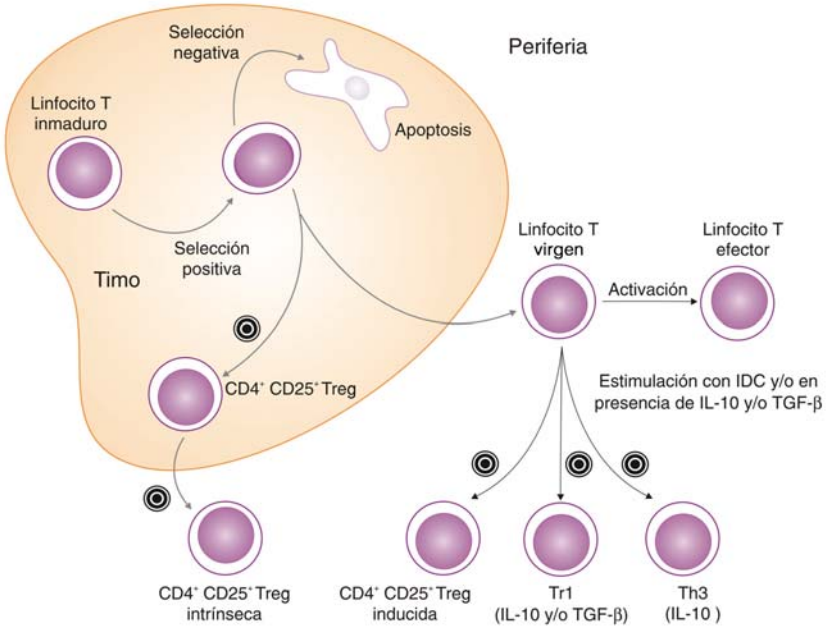


FIGURA 3.
Desarrollo de células Treg en el timo y la periferia.
Las células Treg generadas en el timo reconocen complejos MHC-autoantígenos con alta afinidad por el TCR que por selección negativa escapan de la apoptosis. Las células Th0 pueden diferenciarse en células Treg por un proceso que requiere CPAs inmaduras. Posibles blancos terapéuticos están señalados como dianas de color negro.
iDC: célula dendrítica inmadura; IL: interleuquina; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de célula T.

Tabla 1. Tipos de células Treg.

Origen	Nomenclatura	Molécula de superficie	Sitio de acción	FoxP3	Especificidad	Modo de supresión
Treg naturales	Treg intrínseca GITR, CTLA-4	CD4, CD25,	LT efectores	si	Autoantígenos directo	contacto celular
Treg inducidas	Th3, Tr1	CD4, CD25, GITR, CTLA-4	LT efectores	no	Autoantígenos y antígenos extraños	IL-10, TGF-β
	LT anérgicos	CD4	CPA	no	Cualquiera	Modulación de iDC
	T supresoras	CD8+, CD28-	CPA	no	Péptidos presentados por MHC-I	Inducción de iDC
	Treg doble negativas	CD3, CD4-CD8-	LT CD8	no	Involucra Ly-6A	Eliminación mediada por Fas de LT CD8

CPA: Célula presentadora de antígenos; CTLA-4: antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico; DC: célula dendrítica; iDC: célula dentrítica inmadura; GITR: receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; IL: interleuquina; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TGF-β: factor de crecimiento y transformación beta; LT: Linfocito T

Varios estudios han sugerido que la supresión ocurre por un mecanismo dependiente del contacto célula-célula y que es independiente de la producción de moléculas solubles (14,16,21,22).

Las Treg controlan la síntesis de moléculas coestimuladoras en células dendríticas (DC), las cuales pueden presentar antígenos a células efectoras e inhibir la maduración y por lo tanto, su activación. No obstante, la inducción de una respuesta inmune efectiva en presencia de Treg, requiere un balance entre señales inhibitorias y estimuladoras. Las CPA activadas determinan la posterior tolerancia o activación de la respuesta celular T. En la Tabla 2 se resumen las principales características funcionales de las Treg.

La ausencia de Treg desencadena la aparición de enfermedades autoinmunes como tiroiditis, diabetes y colitis (17,22,23). Otros estudios han mostrado también el papel activo de las Treg en la tolerancia a trasplantes (24-26), además, la prevención de interacciones en la coestimulación (CD28-B7 y CD40-CD154) pueden inducir tolerancia, en las cuales las células T toleradas adquieren propiedades reguladoras.

Pacientes con hipoplasia tímica heredada (síndrome de DiGeorge) desarrollan frecuentemente enfermedad autoinmune, pero los mecanismos por los cuales se da este fenómeno no se conocen (27). Un estudio donde se midieron células CD4+CD25+ en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoidea (AR) no encontró diferencias significativas con respecto de los controles sanos. Sin embargo, cuando se midieron las mismas células en líquido sinovial su número se encontraba elevado (28). Dichas células son funcionales, con actividad reguladora en el líquido sinovial, hecho demostrado en experimentos *in vitro* (29). En otro estudio en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) en sangre periférica se encontró que las Treg estaban disminuidas en los períodos activos de la enfermedad y normales en los períodos de remisión (30).

En diabetes autoinmune, se ha propuesto un mecanismo de acción de las Treg: el desarrollo de la enfermedad autoinmune inicia la producción de autoantígenos en órganos blanco como nódulos linfáticos locales del páncreas. Las Treg son activadas localmente, proliferan y secretan citoquinas inmunomoduladoras, suprimiéndose así la acción de las células efectoras cercanas al sitio de la inflamación. Posteriormente, en este microambiente local se genera una cascada de eventos que incluyen la modulación de la CPA, inhibición de células T patogénicas, competición con linfocitos T autorreactivos, entre otras (Figura 4).

Por lo tanto, la mayoría de casos terminan en una infiltración benigna que indica respuesta inmune fallida. Así

Tabla 2. Principales funciones de las Treg.

Treg	Célula donde actúa	Mecanismos reguladores	Función *In vivo*
NKT	Células tumorales, CPAs, Células T patogénicas	IL-4, IL-10, TGF-β, IFNγ, citotoxicidad	Destrucción de tumores y patógenos, regulación de enfermedades autoinmunes Th1
CD4+CD25-	Linfocitos T y B	por citoquinas, principalmente	Supresión de enfermedades autoinmunes
CD4+CD25+	Linfocitos T y B	contacto célula-célula y citoquinas	Prevención de enfermedades autoinmunes, regulación de la tolerancia a trasplantes, control de la respuesta a patógenos
Qa1-CD8+	Linfocitos T que expresan Qa-1 con auto-antígenos	citotoxicidad contacto célula-célula	Control y mantenimiento de la tolerancia
CD8+CD28-	DCs	Aumento de ILT3 e ILT4 en DCs	Posiblemente regulación de autoinmunidad

NKT: linfocitos T tipo asesinos naturales; ILT3: receptor del transcrito 3 tipo inmunoglobulina; ILT4: receptor del transcrito 4 tipo inmunoglobulina; DCs: células dendríticas.

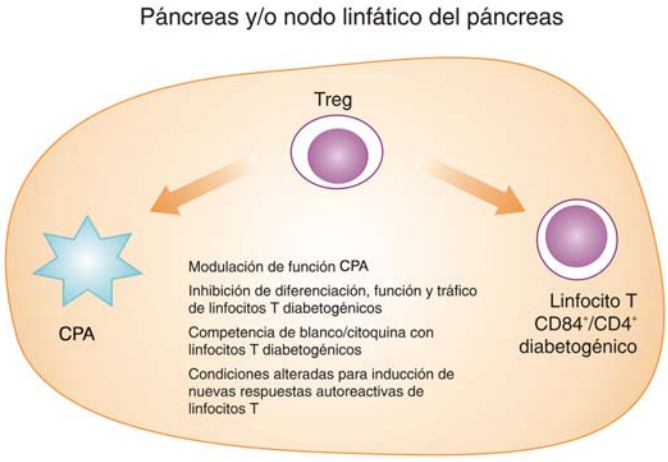

Páncreas y/o nodo linfático del páncreas
Treg
CPA
Modulación de función CPA
Inhibición de diferenciación, función y tráfico de linfocitos T diabetogénicos
Competencia de blanco/citoquina con linfocitos T diabetogénicos
Condiciones alteradas para inducción de nuevas respuestas autoreactivas de linfocitos T
Linfocito T CD84+/CD4+ diabetogénico

FIGURA 4.
Función y mecanismos de acción de las Treg propuestos en diabetes autoinmune.
Células Treg específicas para autoantígenos órgano-específicos (páncreas) llegan a ser activados en su micro-ambiente. La secreción de citoquinas moduladoras e interacciones célula-célula, modifican el tejido de tal manera que la patogénesis de la diabetes disminuye.

por ejemplo, la detección de individuos durante el período de batalla entre tolerancia y autoinmunidad , antes de la destrucción de las células β del páncreas, adquiere importancia en intervenciones inmunoreguladoras que pueden ser efectivas contra la enfermedad (31). Posibles aplicaciones clínicas de las Treg se ilustran en la Tabla 3.

FOXP3

FOXP3/Escurfina es el nombre del gen y la proteína respectivamente. La escurfina es un miembro de la familia de las proteínas con cabeza bifurcada y hélice en forma de ala, que está involucrada en la regulación de la activación celular T y es esencial para la homeostasis del sistema inmune. La escurfina es un represor transcripcional que actúa compitiendo con el factor nuclear de células T activadas (NF-AT/proteína activadora AP-1) (32) en la porción 5' en la región promotora de genes que codifican para citoquinas como IL-4, TNF y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) y principalmente en la IL-2 (32). Hasta el momento se conoce poco de los mecanismos de acción bioquímicos de la escurfina y no se conoce cómo se regula, ya que no posee sitios consenso de fosforilación. Sin embargo se ha propuesto un modelo de acción de la escurfina en tolerancia al embarazo y su relación con los estrógenos (Figura 5). A parte de su dominio bifurcado en la cabeza de la proteína, posee un dominio tipo dedo de zinc y leucinas en cremallera para unirse al DNA. Células T de ratones transgénicos que expresan FoxP3 muestran una disminución significativa en la producción de citoquinas posterior a la estimulación con el antígeno (33,34). Un modelo funcional para FoxP3 en el desarrollo de los linfocitos Treg se aprecia en la Figura 6.

La expresión de FoxP3 es importante en el timo durante etapas tempranas del desarrollo, generando poblaciones de Treg que serán cruciales para la homeostasis. La pérdida funcional de FoxP3 podría resultar en un escape de células T autorreactivas que en condiciones normales llegaría a ser Treg (32).

El gen FOXP3 es altamente conservado y mutaciones mínimas en el gen desencadenan varios síndromes autoinmunes como el IPEX (inmunodisregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X) que causa diarreas intratables, eczema, anemia hemolítica, diabetes e hipotiriodismo, condición asociada a mortalidad temprana (35-37). Estos pacientes no desarrollan células T CD4+ CD25+ en el timo. Hasta el presente, la expresión de este gen parece ser el mejor correlacionado con la identificación de Treg naturales.

Dicho gen está ubicado en el cromosoma X, en la posición Xp11.23, región que hace parte de loci de susceptibilidad para diabetes autoinmune (38,39). Posee 11 exones y 11 intrones y es muy conservado, ya que el único polimorfismo que se conoce es el que induce la enfermedad IPEX, anteriormente mencionada (Figura 7). Sin embargo, recientemente se realizó un trabajo en población japonesa con diabetes autoinmune donde se estudiaron dos microsatélites, uno en el intrón 0 y otro en el intrón 5. Se encontró una diferencia en la actividad potenciadora entre las repeticiones dinucleotídicas $GT_{(15)}$ y $GT_{(16)}$ (Figura 7)(40).

Foxp3 ha sido identificado como un candidato interesante para blancos terapéuticos nuevos en enfermedades autoinmunes, ya que se expresa específicamente en Treg intrínsecas (41). Experimentos con transferencia de genes retrovirales de FOXP3 muestran conversión de células vírgenes CD4+ en Treg intrínsecas. Por lo tanto, componentes que puedan inhibir o activar a Foxp3 podrían tener un potencial terapéutico.

TABLA 3. **Aplicaciones clínicas de las Treg CD4+CD25+.**

Tipo de estímulo	Uso	Descripción del potencial terapéutico
Potenciación de la función de Treg	Trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes, alergia	Transferencia de Treg o potenciación de su función: transducción de FoxP3 *ex vivo*. Generación *ex vivo* de Treg usando citoquinas, agentes farmacológicos o DCs modificadas
Reducción de la función de Treg	Cáncer y enfermedades infecciosas	Remoción de Treg, anti-CTLA-4, CD25, GITR mAbs

GITR MAbs: anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; anti-CTLA-4: anti-antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico.

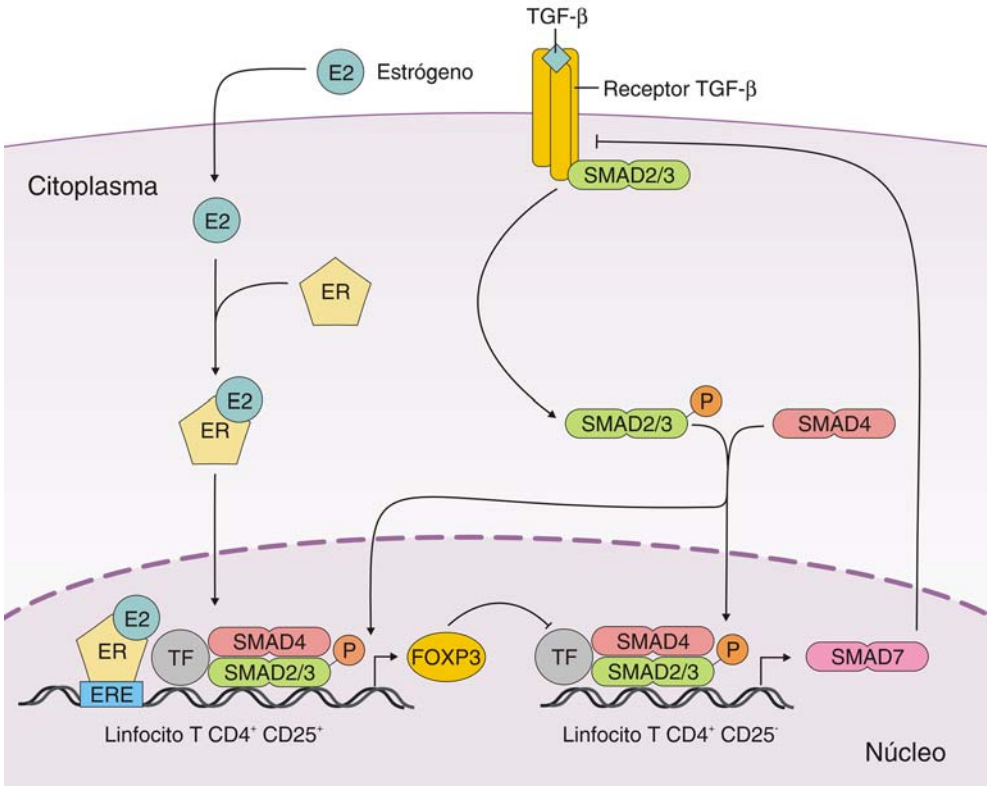


FIGURA 5.

Mecanismo de acción propuesto para FoxP3.

La expresión de FoxP3 se regula por la estimulación de las células CD4+. Los estrógenos pueden inducir la expresión de FoxP3, posiblemente a través de la interacción con su receptor y el promotor de FOXP3. La señalización del TGF-β induce la expresión de FoxP3 por la activación de factores de transcripción como SMAD. El resultado es aumento en la expresión de FoxP3 en las Treg mantenido por mecanismos de señalización mediada por TGF-β. Esto da como resultado final una estabilización y expansión de las Treg. ERE: elementos respondedores a estrógenos; TF: factor de transcripción; E2: estrógenos; TGF-β: factor de crecimiento y transformación β.

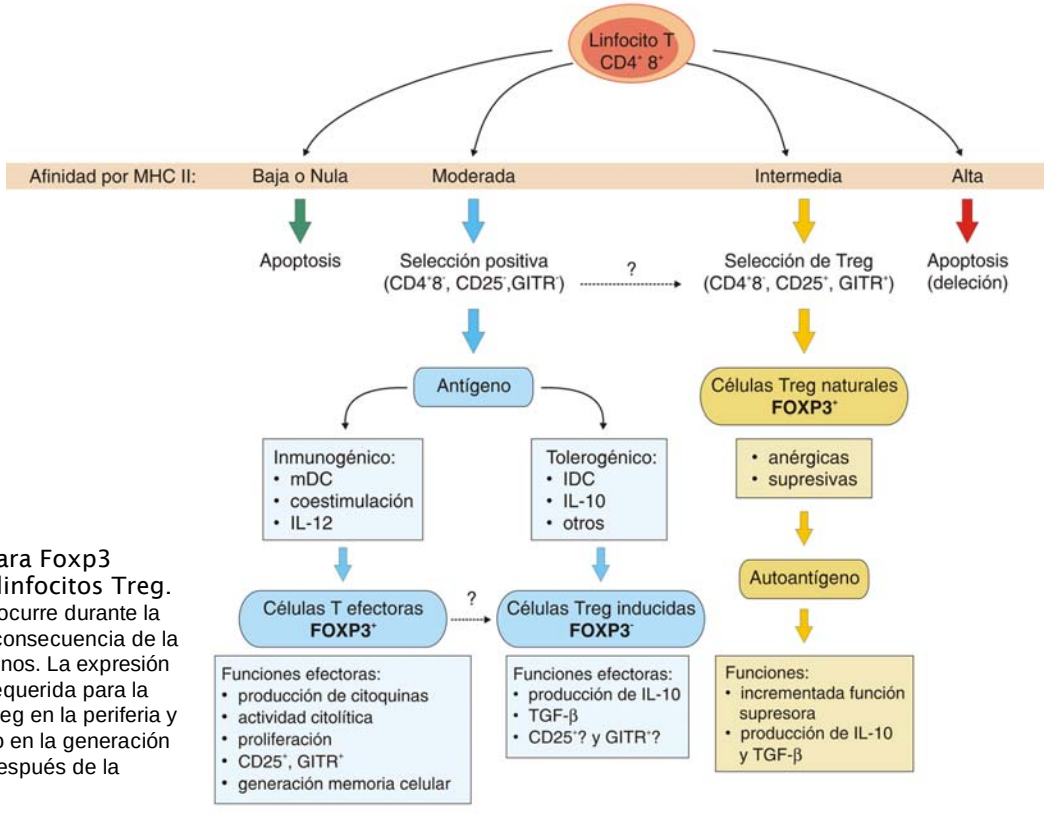


FIGURA 6.

Modelo funcional para Foxp3 en el desarrollo de linfocitos Treg.

La expresión de Foxp3 ocurre durante la selección tímica como consecuencia de la afinidad por auto-antígenos. La expresión continua de Foxp3 es requerida para la función normal de las Treg en la periferia y puede estar involucrado en la generación de las Treg inducidas después de la estimulación.

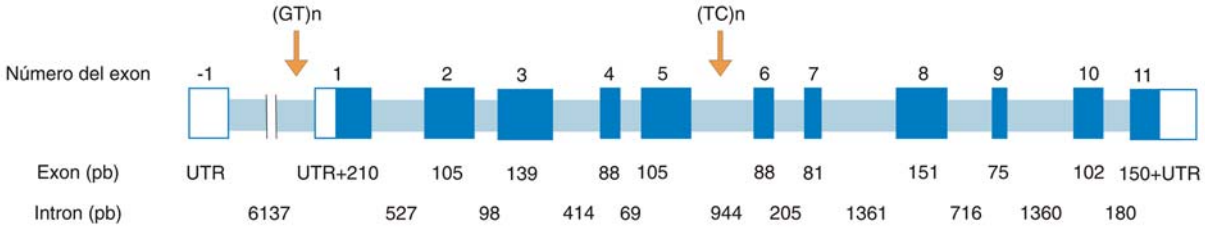


FIGURA 7.
Ubicación genómica del gen Foxp3.
Las áreas codificantes están indicadas en las cajas negras, las no codificantes como cajas blancas blancas y los intrones en líneas horizontales. El tamaño de los exones e intrones en pares de bases es mostrado debajo de las cajas. La ubicación de los microsatélites GT está indicado en el intrón cero y el intrón cinco.

CTLA-4

El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4 ó CD152), es un miembro de la familia de moléculas de superficie celular capaz de finalizar eventos tempranos en cascadas de señalización mediadas por receptores (42). La expresión de CTLA-4 es dependiente de la unión CD28/B7(43,44) (Figura 8). Pero a diferencia de CD28, CTLA-4 es una molécula que inhibe la activación celular T. Por ejemplo, el bloqueo *in vitro* de CTLA-4 por-anticuerpos monoclonales potencia la proliferación celular, aumenta la producción de IL-2, produce cambios en el citoesqueleto de los linfocitos y aumenta la velocidad del ciclo celular por intermedio de las ciclinas (45,46). De esta manera la unión de CD28 no solo potencia la inmunidad sino que posiciona el sistema inmune para la autorregulación tardía en el curso de la respuesta inmune.

El papel regulador de CTLA-4 ha sido demostrado en ratones silenciados para este gen, los cuales desarrollan desórdenes linfoproliferativos que resultan en expansión policlonal de linfocitos T CD4+, aparentemente como resultado de una tolerancia desbalanceada a los autoantígenos (47-49). CTLA-4 regula la tolerancia periférica por diferentes mecanismos. Primero inhibe la activación de células T patogénicas por modulación de la señalización del TCR, específicamente en la fosforilación de la cadena ξ. Sin embargo, los mecanismos de transmisión de la señal a través de la cola citoplasmática de CTLA-4 y el papel que juegan la kinasas PI-3 y la fosfatasa SHP-2, son

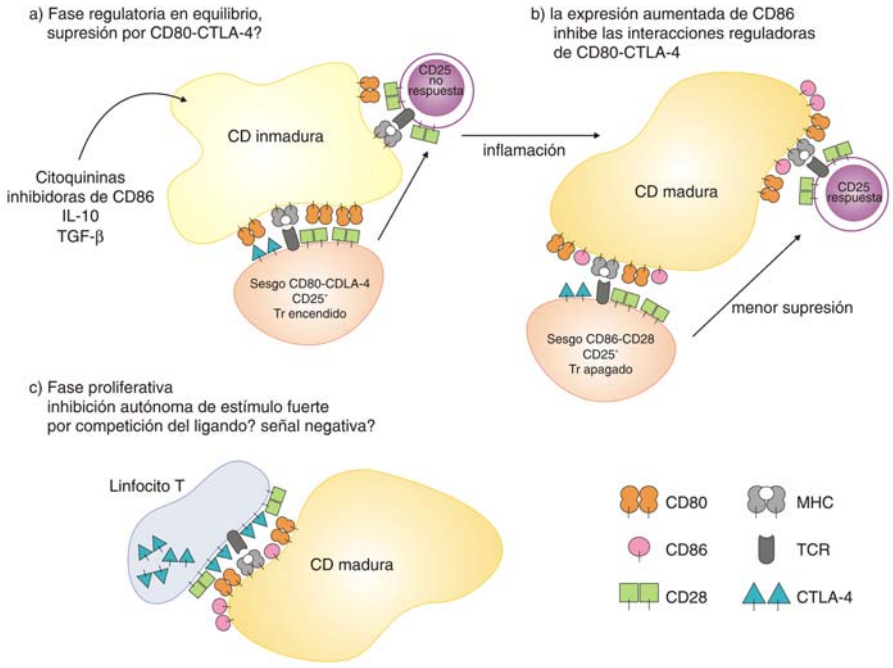


FIGURA 8.
Modelo para interacciones entre CD80 y CTLA-4 (CD152).
a. la iDC, expresa predominantemente CD80 en un estado no inflamatorio. Estas respuestas por lo general son débiles y necesitan de CD28. Por lo tanto las células T vírgenes CD4+CD25- son reemplazadas por células CD4+CD25+, las cuales son potenciadas por interacciones CD80-CTLA-4. Así, CTLA-4 actúa como mecanismo "umbral" limitando estímulos débiles. Citoquinas antiinflamatorias como IL-10 pueden suprimir a CD86 pero no a CD80 y promover este mecanismo. b. En presencia de estímulos inflamatorios como lipopolisacáridos (LPS), las DC maduran y expresan cantidades notables de CD86, los cuales se sobreponen a la expresión de CD80 -CTLA-4 de las Treg inhibiendo la supresión. Así la expresión de CD86 inhibe la acción de las Treg y promueve la co-estimulación. c. En células T que están proliferando, CTLA-4 se expresa de una manera mayor, posterior a la división celular y respuesta T, para que la respuesta pueda ser atenuada.

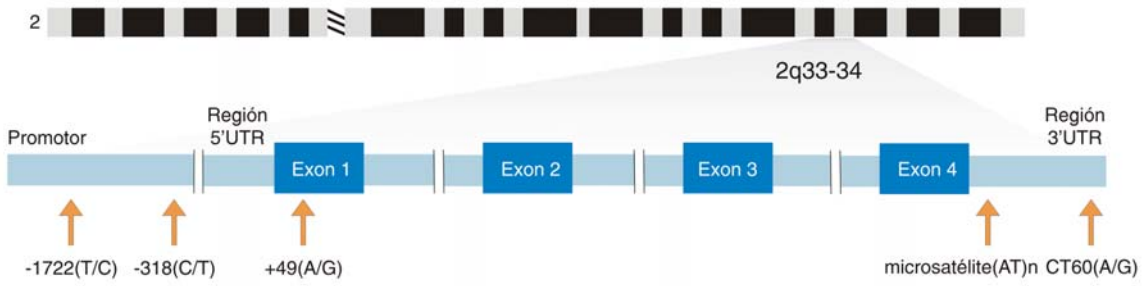


FIGURA 9.
Ubicación genómica del gen CTLA-4 en el brazo largo del cromosoma 2.
Los intrones están denotados por líneas horizontales invertidas. La ubicación de los polimorfismos está representado por las flechas y se a incluido algunos microsatélites para el estudio de dicha región.

desconocidos. Algunos investigadores han sugerido que una consecuencia de la expresión de CTLA-4 es simplemente competir con CD28 por los ligandos CD80 y CD86 (50,51). A este respecto, es importante recalcar que CTLA-4 solamente actúa en *cis* junto con el TCR, diferente del CD28 que actúa tanto en *cis* como en *trans* cuando B7 está expresado en una CPA sin antígeno (52). Segundo, células Treg expresan constitutivamente CTLA-4 que se une a células efectoras para alterar la transducción de señales y la posterior liberación de citoquinas. La unión de CTLA-4 con su ligando, produce la liberación del TGF-β, lo cual ha sido propuesto como uno de los mecanismos de acción de las Treg. Tercero las cascadas de señalización de CTLA-4 afectan el patrón de expresión de citoquinas, por ejemplo, el bloqueo entre CTLA-4 y B7 hace que se de un patrón de expresión de citoquinas Th2 (53,54).

El gen que codifica para CTLA-4 se ubica en el brazo largo del cromosoma 2 en la posición 2q33 (55) y existe solo una copia por genoma haploide. El gen posee un tamaño de 6.2 kb y tiene cuatro exones. El primer exón codifica para una secuencia líder de 37 aminoácidos, que conserva una secuencia consenso Kozak con la señal del codón iniciador ATG (Met) y una caja TATA a 100 pb después de la secuencia consenso. La secuencia señal de 37 aminoácidos es cortada durante su síntesis. La proteína madura contiene 124 aminoácidos extracelulares con un 30% de homología con los dominios de las inmunoglobulinas, una región transmembrana de 26 aminoácidos y una cola citoplasmática de 36 aminoácidos. Al final del exón 4 se encuentra una región no traducida (UTR) con 1150 pb la cual posee un microsatélite AT. Los exones 1 y 2 están separados por un intrón de 500 pb y el 2 y 3 por uno de 1100pb. Este gen codifica dos trascritos de 1800 pb y 800 pb, respectivamente, con sitios de poliadenilación alternativos (56) (Figura 9).

Tres polimorfismos han sido reportados en el gen del CTLA-4. El primero es un microsatélite dinucleotídico en el exón 3 y se conocen 23 alelos aproximadamente(57). El segundo polimorfismo es un cambio de una G por A en la posición 49 (G49A) del exón 1. Este polimorfismo genera un cambio de alanina por treonina en el codón 17 de la secuencia líder (58,59). El tercer polimorfismo es un

TABLA 4. **Búsquedas genómicas en humanos y ratones con enfermedades autoinmunes que muestran ligamiento con la región CTLA-4/ctla-4.**

Enfermedad	Especie	Intervalo	Ref
DMID	Ratones NOD	D1Mit72 (19cM) - D1Mit19 (37cM)	69
	Humanos (caucásicos)	2q31-34	70
	Ratones NOD	D1Mit3 (11cM) – D1Nds14/Vil (41cM)	71
	Ratones NOD	D1nds4 (13cM) – D1Nds7/Bcl2 (60cM)	71
LES	Humanos (americanos)	2q21-q33	72
	Ratones F1 BXSB	D1Mit3 (11cM) – D1Nds 2 (54 cM)	73
	Humanos caucásicos	2q32	74
Asma	Humanos Hispanos	2q33	75
AR	Humanos (caucásicos)	2q33-37	76
EC	Humanos (caucásicos)	2q33	77
EII	Humanos (caucásicos)	2q24-34	78

Estudios en humanos que tuvieron un multiple lod score (MLS) >1.0 para la región que contiene el locus del CTLA-4 el brazo largo del cromosoma 2 (2q33) y en murinos, ctla-4 en el cromosoma 1. 30.1 cM del centrómero en el ratón. El gen CTLA-4 en ratas no ha sido descrito, pero los genes cercanos en ratón y humano se han encontrado en el cromosoma 9 de la rata. Es por esto que en estudios de ligamiento se han involucrado ratas para ayudar al entendimiento y comprensión del estudio de dicho gen. *Bcl2*: locus 2 de leucemia/linfoma de células B; DMID: diabetes melitus insulino-dependiente; NOD: ratones diabéticos no obesos; LES: lupus eritematoso sistémico; AR: artritis reumatoidea; EC: enfermedad celíaca; EII: enfermedad inflamatoria intestinal;*Vil*: gen de la vilina; Ref: referencia.

Tabla 5. Principales estudios que muestran asociación y/o ligamiento positivo en polimorfismos del gen CTLA-4.

Enf	Polimorfismo	Tipo de estudio	Población	Comentario	Ref
EG	C-318T	Casos y controles	Alemanes (caucásicos)	No asociación	79
	C-318T y A49G	Casos y controles	Canadienses (caucásicos)	Asociación fuerte con los genotipos CT de –318 y AA de +49	79
	A49G	Casos y controles	Japoneses (asiáticos)	Asociación débil con el alelo G	80
	3'UTR	Casos y controles	Reino unido (caucásicos)	Asociación con el genotipo 106pb	81
	A49G	Casos y controles	Reino unido (caucásicos)	Asociación muy fuerte con el genotipo y en esta población se ha podido replicar este estudio, tanto en estudios de familias como en casos y controles	82, 83
	A49G	Casos y controles	Alemanes (caucásicos)	Asociación fuerte con el genotipo	84
	A49G	Casos y controles	Polacos (caucásicos)	El genotipo AA está asociado con poca severidad de neuropatía óptica	85
	A49G	Casos y controles	Iraníes (asiáticos)	Asociación con el alelo G	86
	A49G y CT60	Casos y controles	Caucásicos y familias	Asociaciones débiles para los dos SNPs, sin embargo cuando se analizó con el HLA-DR se aumentó notablemente la asociación	87
	JO31	Casos y controles	Japoneses (caucásicos)	Asociación fuerte	88
	AT 3'UTR	Casos y controles	Caucásicos	Este estudio además de la asociación, ha demostrado la correlación entre el genotipo 86/86 pb y el control bajo de la proliferación celular T	89
TH	C-318T y A49G	Casos y controles	Canadienses (caucásicos)	Asociación con el genotipo CT para el –318 y el haplotipo –318 CT y A49G AA	80
	A49G y AT 3'UTR	Casos y controles	Japoneses (asiáticos)	Asociación débil con el Alelo G y asociación con la repetición de 106 pb	81
	A49G	Casos y controles	Alemanes (caucásicos)	Asociación débil con el genotipo	90
	A49G	Casos y controles	Canadienses (caucásicos)	Asociación débil con el alelo	90
DMID	A49G y AT 3'UTR	Familias	México (Hispanos)	Asociación con el alelo G y el alelo 17 respectivamente, además el trabajo posee es demostrado en otros grupos étnicos	91
	A49G	Casos y controles	Polacos (caucásicos)	Asociación con el genotipo GG	92
	A49G	Casos y controles	Caucásicos	Asociación débil con el alelo A	93
	A49G	Casos y controles	Alemanes (caucásicos)	Asociación débil con el genotipo	84
	A49G	Familias	Italianos (caucásicos)	Asociación con el alelo G	59
	A49G	Familias	Españoles (caucásicos)	Asociación con el alelo G	59
Vitiligo	AT 3'UTR	Casos y controles	Reino unido (caucásicos)	Asociación con la repetición 106 pb	94
MG	AT 3'UTR	Casos y controles	Suecos (caucásicos)	Asociación con la repetición 104 pb	95
EM	A49G	Casos y controles	Noruegos (caucásicos)	Asociación con el genotipo	96
	C-318T y A49G	Casos y controles y familias	Suecos (caucásicos)	Asociaciones débiles en genotipo GG y alelo G	97
LES	CT60 A/G	Casos y controles	Españoles (caucásicos)	Asociación con el alelo G. Este polimorfismo está ubicado en una región clave para el splicing que da lugar al CTLA-4 soluble	98
	T-1872C	Casos y controles	Españoles (caucásicos)	Asociación con el alelo C	99
	T-1872C	Casos y controles	Koreanos (asiáticos)	Asociación con el genotipo TT	100
	AT 3'UTR	Casos y controles	Portugueses (caucásicos)	La repetición de 106 pb fue protectora y la de 104 pb fue asociada	101
AR	A49G	Casos y controles	Españoles (caucásicos)	Asociación con el genotipo AG	102
	A49G	Casos y controles	Japoneses (asiáticos)	Asociación con el genotipo AG y es dependiente de la asociación con HLA-DRB1*0405.	103

EG: enfermedad de Graves; TH: tiroiditis de Hashimoto; DMID: diabetes mellitus insulino-dependiente; MG: miastenia gravis; EM: esclerosis múltiple; LES: lupus eritematoso sistémico; AR: artritis reumatoidea.

cambio de C por T en la posición -318 (C-318T) en la región promotora (60). Recientemente ha sido descrito otro polimorfismo llamado CT60 A/G ubicado en la región 3'UTR (61). Además, en estudios de búsquedas de genes candidatos se ha demostrado un ligamiento importante para la región 2q33 en humanos y su región sinténica en ratones, las cuales corresponden al loci del CTLA-4 (Tabla 4).

Basados en los estudios de genes candidatos, derivados de estudios en modelos animales relacionados con las funciones bioquímicas y fisiológicas de CTLA-4, se ha investigado el papel de la genética en la relación entre dicho gen y enfermedades autoinmunes. La primera asociación realizada entre CTLA-4 y enfermedades autoinmunes fue hecha en enfermedad de Graves (62). Posteriormente, se han desarrollado varios estudios que evalúan la relación entre los polimorfismos del gen CTLA-4 y las enfermedades autoinmunes (Tabla 5).

Estudios recientes han demostrado que por medio de un mecanismo conocido como rearreglo alternativo en el gen del CTLA-4, se produce una proteína que carece de región transmembrana y por lo tanto representa una forma soluble de la proteína conocida como CTLA-4 soluble (sCTLA-4) (63). sCTLA-4 es un receptor funcional y los aminoácidos críticos para la unión con B7 quedan, por lo tanto, la acción de sCTLA-4 se conserva (64). Varios artículos muestran que el sCTLA-4 está aumentado en pacientes con LES, tiroiditis y miastenia gravis (64-66). Otro estudio ha demostrado el aumento de niveles de sCTLA-4 en escleroderma difusa pero no en la forma local. El aumento de sCTLA-4 soluble fue asociado con fibrosis de la piel, daño vascular digital y fibrosis pulmonar (67). El

Tabla 6. Estudios preclínicos y clínicos utilizando CTLA4Ig.

Autor (ref)	Modelo de estudio/diseño	Principales hallazgos
Linsley y col (104)	In vitro	Inhibición de la proliferación de linfocitos T y producción de inmunoglobulinas.
Linsley y col (105)	Murino	Supresión de la formación células formadoras de placas en CRC y respuesta primaria por Ac contra KLH; los esplenocitos murinos mostraron una respuesta antígeno-célula T específica alterada.
Wallace y col (106)	Murino	Indujo no respuesta inmune a CRC de larga duración pero reversible; bloqueo en la producción de ARNm de citoquinas en las células T.
Tivol y col (107)	Murino	Tratamiento de los ratones deficientes de CTLA4 previene la linfoproliferación y la infiltración de múltiples órganos; no efecto prolongado
Lenschow y col (108)	Modelo murino NOD	Tratamiento temprano previene el comienzo de diabetes autoinmune
Chandraker y col (109)	Modelos en ratas F344 y LEW de rechazo de trasplante renal	Una inyección a las 8 semanas post-trasplante previene el desarrollo de proteinuria y cambios histológicos de rechazo renal
Khoury y col (110) en	Modelo en rata Lewis	Supresión de la actividad de la enfermedad e inhibición de citoquinas Th1 de EAEel SNC.
Levisetti y col (111)	Modelo cynomolgus (mono) de trasplantes de islotes de células pancreáticas	Algunos animales tratados (2/%) tuvieron una mayor sobrevida del injerto.
Kirk y col (112)	Mono rhesus-trasplante renal	Tratamiento con y sin anti-CD40L prolongó el tiempo libre de rechazo
Krieger y col (113)	Mono rhesus-trasplante cardiaco	Tratamiento con CTLA4Ig + anti-CD4Ig prolongó la sobrevida del injerto.
Finck y col (114)	Ratones hembra NZB/NZW F1	El tratamiento disminuyó la producción de anticuerpos anti-DNA nativo e incrementó la sobrevida.
Mihara y col (115)	Ratones hembra NZB/NZW F1	La administración de adenovirus que expresaban CTLA4Ig llevó a mejoría en la sobrevida, disminución de anti-DNA nativo y disminución en la proteinuria
Daikh y Wofsy (116)	Ratones hembra NZB/NZW F1	El manejo combinado con ciclofosfamida + CTLA4Ig produjo mejoría en la proteinuria, incremento en la sobrevida y disminución de los anticuerpos anti-DNA nativos.
Abrams y col (117)	Estudio fase I	Mejoría clínica e histológica en 43 pacientes con psoriasis
Moreland y col (118)	ECA	Las dosis más altas produjeron mejoría ACR 20,50 y 70 comparada contra placebo en 214 pacientes con AR.
Kremer y col (119)	ECA	Tratamiento con CTLA4Ig (10 mg/kg) produjo mejoría en ACR 20,50 y 70 comparada contra placebo en 339 pacientes con AR en manejo con MTX.
Weinblatt y col (120)	ECA	Tratamiento con CTLA4Ig (2 mg/kg) produjo mejoría en ACR 20,50 y 70 comparado con placebo en 121 pacientes con AR en manejo concomitante con etanercept.

CRC: células rojas de cordero; Ac: anticuerpo; KLH: hemocianina; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; NOD: ratones diabéticos no obesos; EAE: encefalitis autoinmune experimental; NZB/NZW: ratones nueva zelanda blancos y negros; DNA: ácido desoxirribunucleico; ECA: estudio clínico aleatorizado; ACR: colegio americano de reumatología. ACR 20,50 y 70: Índice que muestra mejoría en el 20, 50 y 70% de los síntomas respectivamente.

sistema CD28/CTLA-4/B7 ha sido uno de los factores que juega un papel importante en la fibrosis. En modelos de estudio murinos de fibrosis, ratones que son deficientes en CD28 muestran un tamaño reducido de las lesiones fibróticas en el pulmón, lo cual se asocia con la baja de producción de quimoquinas y citoquinas claves en esta patología (68).

El aumento de los niveles de sCTLA-4 fue asociado con escleroderma difusa. Por lo tanto, los niveles elevados de sCTLA-4 pueden aumentar la expresión de CD28 e inhibir la acción del CTLA-4 de membrana, lo cual terminaría en desarrollo de la fibrosis.

Aplicación clínica

Debido a su rol crucial en las vías coestimuladoras, y a la importancia de éstas en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, rechazo de órganos trasplantados e inmunidad antitumoral, la molécula CTLA4Ig está siendo evaluada como una novedosa estrategia terapéutica en estas patologías (104-120).

En la Tabla 6 se presenta un resumen de los principales estudios tanto preclínicos, como de fase clínica en los que se ha utilizado CTLA4Ig.

Referencias

1. Schwartz RH. T cell anergy. Annu Rev Immunol 2001; 305:305-324
2. Chen L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. Immunol Today 1998; 19:27-30
3. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. Nat Rev Immunol 2004; 4:336-347
4. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Immunity 2002; 16: 311-323
5. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, et al. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. Nat Immunol 2002; 3:33-41
6. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. Eur J Immunol 2004; 34:623-630
7. Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Immunol 2002; 168:1644-1648
8. Pacholczyk R, Kraj P, Ignatowicz L. Peptide specificity of thymic selection of CD4+CD25+ T cells. J Immunol 2002; 168:613-620
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev 2001; 182:18-32
10. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, et al. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. J Immunol 1998; 160:1212-1218
11. Piccirillo CA and Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. J Immunol 2001; 167:1137-1140
12. Thornton AM and Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. J Immunol 2000; 162:183-190
13. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature 1997; 389:737-742
14. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Ann Rev Immunol 2001; 19:683-765
15. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes Infect 2001; 3:947-954
16. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001; 182: 207-214
17. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol 1998; 10:1969-1980
18. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. J Immunol 1999; 162:5317-5326
19. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995; 155:1151-1164
20. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, et al. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. Immunol Rev; 182:58-67
21. Sanchez-Fueyo A, Weber M, Domenig C, et al. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. J Immunol 2002; 168:2274-2281
22. Chiffoleau E, Beriou G, Dutartre P, et al. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. J Immunol 2002; 168:5058-5069
23. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J Exp Med 2002; 195:1641-1646
24. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hipoplasia. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:1129-1131
25. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 2003; 33:215-223
26. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus Erythematosus. J Autoimminuty 2003; 21:273-276
27. Homann D, von Herrath M. Regulatory T cells and type 1 diabetes. Clin Immunol 2004; 112:202-209
28. Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, et al. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. J Immunol 1999; 162: 2546-2554
29. Kanangat S, Blair P, Reddy R, et al. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. Eur J Immunol 1996; 26:161-165
30. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. J Clin Invest 2000; 106:R75-R81
31. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Gen 2001; 27:20-21
32. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Gen 2001; 27:18-20
33. Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, et al. A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. Nat Gen 1998; 19:301-302
34. Nerup J, Pociot F; European Consortium for IDDM Studies. A genome-wide scan for type 1-diabetes susceptibility in Scandinavian families: identification of new loci with evidence of interactions. Am J Hum Genet 2001; 69:1301-1313
35. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, et al. a functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. Immunogenetics 2003; 55:149-156
36. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003; 299:1057-1061
37. Lee KM, Chuang E, Griffin M, et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. Science 1998; 282:2263-2266
38. Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. J Immunol 1996; 157:4762-4770
39. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. J Exp Med 1996; 183:2541-2550

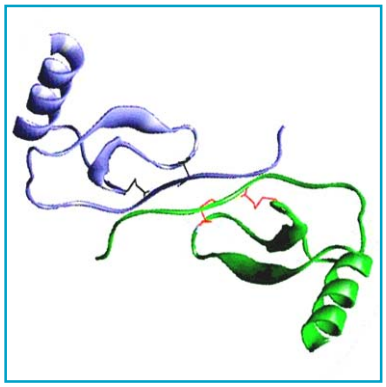
40. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. Immunity 1994; 1:405-413
41. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. J Exp Med 1996; 183:2533-2540
42. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity 1995; 3:541-547
43. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science 1995; 270:985-988
44. Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. Immunity 1997; 7:885-895
45. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. Immunity 1997; 7:445-450
46. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, et al. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. J Immunol 2000; 164:5319-5327
47. Griffin MD, Hong DK, Holman PO, et al. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). J Immunol 164:4433-4442
48. Khattri R, Auger JA, Griffin MD. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. J Immunol 1999; 162:5784-5791
49. Oosterwegel MA, Mandelbrot DA, Boyd SD, et al. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. J Immunol 163:2634-2639
50. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, et al. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. Eur J Immunol 1988; 18:1901-1905
51. Harper K, Balzano C, Rouvier E, et al. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. J Immunol 1991; 147:1037-1044
52. Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, et al. Dinucleotide repeat polymorphism at the human CTLA4 gene. Nucleic Acids Res 1991;19: 4018
53. Larsen ZM, Kristiansen OP, Mato E, et al. IDDM12 (CTLA4) on 2q33 and IDDM13 on 2q34 in genetic susceptibility to type 1 diabetes (insulin-dependent). Autoimmunity 1999; 31:35-42
54. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Hum Mol Genet 1996; 5:1075-1080
55. Deichmann K, Heinzmann A, Bruggenolte E, et al. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. Biochem Biophys Res Commun 1996; 225:817-818
56. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003; 423:506-511
57. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, et al. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:41-45
58. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. Rheum Dis Clin North Am 1996; 32:695-708
59. Oaks MK, Hallett KM. a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. J Immunol 2000; 164:5015-5018
60. Liu MF, Wang CR, Chen PC, et al. Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol 2003; 57:568-572
61. Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, et al. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. J Neuroimmunol 2002; 130:224-232
62. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis. Rheumatology 2004; 43:1261-1266
63. Okazaki T, Nakao A, Nakano H, et al. Impairment of bleomycin-induced lung fibrosis in CD28-deficient mice. J Immunol 2001; 167:1977-1981
64. Braun J, Donner H, Siegmund T, et al. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. Tissue antigens 1998; 51:563-566
65. Awata T, Kurihara S, Iitaka M, et al. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. Diabetes 1998; 47:128-129
66. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. Clin Endocrinol 1997; 46:551-554
67. Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, et al. The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2398-2401
68. Vaidya B, Imrie H, Perros P, et al. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. Hum Mol Genet 1999; 8:1195-1199
69. Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:143-146
70. Frydecka I, Daroszewski J, Suwalska K, et al. CTLA-4 (CD152) gene polymorphism at position 49 in exon 1 in Graves' disease in a Polish population of the Lower Silesian region. Arch Immunol Ther Exp 2004; 52:369-374
71. Kalantari T, Mostafavi H, Pezeshki AM, et al. Exon-1 polymorphism of ctla-4 gene in Iranian patients with Graves' disease. Autoimmunity 2003; 36:313-316
72. Ban Y, Concepcion ES, Villanueva R, et al. Analysis of immune regulatory genes in familial and sporadic Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:4562-4568
73. Furugaki K, Shirasawa S, Ishikawa N, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. J Hum Genet 2004; 49:166-168
74. Takara M, Kouki T, DeGroot LJ. CTLA-4 AT-repeat polymorphism reduces the inhibitory function of CTLA-4 in Graves' disease. Thyroid 2003; 13:1083-1089
75. Donner H, Braun J, Seidl C, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:4130-4132
76. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. Hum Mol Genet 1997; 6:1275-1282
77. Krokowski M, Bodalski J, Bratek A, et al. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland. Diabetes Metab 1998; 24:241-243
78. Djilali-Saiah I, Larger E, Harfouch-Hammoud E, et al. No major role for the CTLA-4 gene in the association of autoimmune thyroid disease with IDDM. Diabetes 1998; 47:125-127
79. Kemp EH, Ajjan RA, Waterman EA, et al. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. Br J Dermatol 1999; 140:73-78
80. Huang D, Liu L, Noren K, et al. Genetic association of Ctla-4 to myasthenia gravis with thymoma. J Neuroimmunol 1998; 88:192-198
81. Harbo HF, Celius EG, Vartdal F, et al. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. Tissue Antigens 1999 53:106-110
82. Ligers A, Xu C, Saarinen S, et al. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis 1999; 97:182-190
83. Torres B, Aguilar F, Franco E, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50:2211-2215
84. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, et al. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus Erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50:328-329
85. Hudson LL, Rocca K, Song YW, et al. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. Hum Genet 2002; 111:452-455
86. Barreto M, Santos E, Ferreira R, et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. Eur J Hum Genet 2004; 8:620-626
87. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, et al. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1999; 53:296-300
88. Yanagawa T, Gomi K, Nakao EI, et al. CTLA-4 gene polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2000; 27: 2740-2742
89. Colucci F, Bergman ML, Penha-Goncalves C, et al. Apoptosis resistance of nonobese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 8670-8674
90. Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, et al. A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Nat Genet 1998; 19:292-296
91. Ghosh S, Palmer SM, Rodrigues NR, et al. Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. Nat Genet 1993; 4:404-409
92. Gaffney PM, Kearns GM, Shark KB, et al. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:14875-14879
93. Hogarth MB, Slingsby JH, Allen PJ, et al. Multiple lupus susceptibility loci map to chromosome 1 in BXSB mice. J Immunol 1998; 161: 2753-2761
94. Moser KL, Neas BR, Salmon JE, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:14869-14874

95. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. Nat Genet 1997; 15:389-392
96. Linsley PS, Brady W, Urnes M, et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. J Exp Med 1991; 174:561-569
97. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. Science 1992; 257:792-795
98. Wallace PM, Rodgers JN, Leytze GM, et al. Induction and reversal of long-lived specific unresponsiveness to a T-dependent antigen following CTLA4Ig treatment. J Immunol 1995; 154:5885-5895
99. Tivol EA, Boyd SD, McKeon S, et al. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. J Immunol 1997; 158:5091-5094
100. Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, et al. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. J Exp Med 1995; 181:1145-1155
101. Chandraker A, Azuma H, Nadeau K, et al. Late blockade of T cell costimulation interrupts progression of experimental chronic allograft rejection. J Clin Invest 1998; 101:2309-2318
102. Levisetti MG, Padrid PA, Szot GL, et al. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. J Immunol 1997; 159:5187-5191
103. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:8789-8794
104. Krieger NR, Yuh D, McIntyre WB, et al. J Surg Res 1998; 76:174-178
105. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA 4Ig. Science 1994; 265:1225-1227
106. Mihara M, Tan I, Chuzhin Y, et al. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 2000; 106:91-101
107. Daikh DI, Wofsy D. Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide. J Immunol 2001; 166:2913-2916
108. Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. J Clin Invest 1999; 103:1243-1252
109. Moreland LW, Alten R, Van den Bosch F, et al. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. Arthritis Rheum 2002; 46:1470-1479
110. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. N Engl J Med 2003; 349:1907-1915
111. Weinblatt, Schiff M, Goldman M, et al. A pilot, multi-center, randomized, double-blind, placebo controlled trial of a co-stimulation blocker CTLA-4Ig (2mg/Kg) given monthly in combination with etanercept in active rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheum 2002; 46:S204 (abstract)
112. Coffer P and Burgering B. Forkhead-Box Transcription factors and their role in the immune system. Nat rev Immunol 2004; 4:889-899
113. Cornelis F, Faure S, Martinez M, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:10746-10750
114. Holopainen P, Naluai AT, Moodie S, et al. Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. Tissue antigens 2004; 63:212-222
115. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. Hum Mol Genet 2004; 13:763-770
116. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoinmmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. J Exp Med 1982; 156:1577-1586
117. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, et al. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. Clin Exp Immunol 1973; 15:225-236
118. Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, et al. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. J Exp Med 1986; 169:1669-1680
119. Van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, et al. CD4+ CD25+ regulatory Tcells in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2004;50:2775-2785
120. Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, et al. CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. J Immunol 1995; 155:4521-4524

11

CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS

Hernán Martínez
Fabio Jiménez
Carlos Estrada
Juan-Manuel Anaya
Marlón Quiñónes



En este capítulo se describen algunas de las características generales de dos familias de moléculas primordiales para el funcionamiento del sistema inmune llamadas citoquinas y una extensa familia de citoquinas quimiotácticas, conocidas como quimioquinas. Ambas familias están compuestas de factores solubles con la habilidad de transmitir mensajes entre las células del sistema inmune, y entre éste y otros sistemas, como por ejemplo el sistema endocrino o nervioso. Se han identificado más de 100 citoquinas, 50 quimioquinas y un grupo igualmente grande de receptores para estas moléculas. Como se puede deducir al contemplar el inmenso número de citoquinas y quimioquinas, es imposible imaginar que en un solo capítulo se pueda describir con detalles la complejidad existente en esas familias. De esta forma, el capítulo se concentrará en describir las propiedades generales, y en resaltar algunos ejemplos de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias en los cuales se puede apreciar claramente el papel de las citoquinas y las quimioquinas.

Contenido

Propiedades generales de las cito/quimioquinas: redundancia, promiscuidad y poliespeirismo
Citoquinas
- Citoquinas, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad

Quimioquinas
- Estructura
- Función en el sistema inmune
- Papel en diferentes enfermedades

Propiedades generales de las cito/quimioquinas: redundancia, promiscuidad y poliespeirismo

En muchos casos, como en la batalla contra infecciones, los mensajes que las citoquinas o las quimioquinas (cito/quimioquinas) transmiten son indispensables para la supervivencia del individuo. Al menos cuatro propiedades parecen asegurar que el mensaje es transmitido (1). Primero, las cito/quimioquinas son *redundantes*, significa ello, que la misma cito/quimioquina actúa en varios tipos celulares diferentes y que diferentes cito/quimioquinas tienen acciones biológicas que se sobreponen; segundo, las cito/quimioquinas son *promiscuas*, implicando que aunque normalmente se unen a un receptor específico sobre la superficie de las células blanco, el cual está acoplado a moléculas que inician una señal intracelular o de traducción, la misma molécula puede interactuar con varios receptores diferentes para mediar sus funciones; la *tercera* propiedad de las cito/quimioquinas es *el poliespeirismo*, que significa que una célula puede producir varias de ellas. Finalmente, las cito/quimioquinas son *pleiotrópicas*, es decir que tienen varios efectos. Estos efectos pueden ser inducidos de manera paracrina o autocrina y, ocasionalmente, endocrina. Las cito/quimioquinas pueden funcionar en forma individual, aditiva, sinérgica, inhibitoria o antagónica.

Algunas cito/quimioquinas pueden estar presentes en la membrana celular y otras pueden ser mantenidas como reserva en la matriz extracelular, como por ejemplo la citoquina TGF-β, o la quimioquina fractalquina (2).

Citoquinas

La clasificación de las citoquinas es algo compleja, porque una sola citoquina puede pertenecer a más de una categoría. Las citoquinas pueden clasificarse de varias maneras, según la fase de la respuesta inmune en la que se desempeñen: citoquinas de la respuesta innata (IL-1, TNF, quimioquinas, IL-12, interferones tipo I, IL-10) o de la respuesta específica (IL-2, IL-4, IL-5, IFNγ, TGFβ) (2); según su función biológica: hematopoyéticas (SCF, IL-3, IL-7, EPO, GM-CSF, M-CSF, G-CSF), de crecimiento y diferenciación (factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de fibroblastos, TGFβ), quimiotácticas (IL-8, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, RANTES), inmunorreguladoras (TGFβ, IFNα, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-18), proinflamatorias (IL-1α y β, TNFα y β, IL-6, IL-17); y antinflamatorias (IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13). Aunque aún no haya un acuerdo sobre el tema y quizás ninguna de estas clasificaciones sea la más ideal, esta última parece ser la más aceptada (3) (Tabla 1). En la Tabla 2 se muestran los aspectos más relevantes de las principales citoquinas conocidas hasta el momento.

La nomenclatura de las citoquinas está basada en sus fuentes celulares (2). Las citoquinas producidas por los monocitos/macrófagos se conocen también como monoquinas y las secretadas por los linfocitos T y B como linfoquinas. Varias de las linfoquinas y monoquinas que interactúan con las células del sistema inmune son llamadas interleuquinas (IL). La producción de cierto patrón de citoquinas (sobretodo por las células T $CD4^+$ o ayudadoras) sirve para determinar dos subpoblaciones de linfocitos T ayudadores, las Th1 y las Th2 (ver capítulo 7). Las principales citoquinas producidas por linfocitos Th1 son: IL-2, interferón γ (IFNγ), la IL-12 y el factor de necrosis tumoral (TNF), α y β. Las citoquinas características de la respuesta Th2 son: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

La principal función de las células Th1 es estimular la defensa contra infecciones mediada por macrófagos, especialmente contra microorganismos intracelulares; también están implicadas en linfotoxicidad y activación de células asesinas naturales (NK). Las citoquinas Th2 conducen las reacciones inmunes mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos involucrados en procesos alérgicos y respuesta a infecciones helmínticas. Aunque hay tendencia a generalizar que la respuesta Th1 es celular y la Th2 es humoral, no siempre es así. Además, en contraste con lo que sucede en roedores (en donde la mayor parte de los estudios de estas poblaciones celulares se han realizado), en humanos hay una división menos marcada entre Th1 y Th2, y la diferenciación es más reversible (3). El IFNγ por ejemplo, induce el cambio de isotipo de anticuerpos a IgG2a en el ratón (4, 5). Existe un antagonismo entre las citoquinas Th1 y Th2: la IL-4 y la IL-10 bloquean la función de Th1, mientras que el IFNγ bloquea la proliferación de células Th2 y los efectos de sus citoquinas (4, 5). No obstante, no todos los linfocitos T se pueden clasificar en Th1 o Th2, y esta dicotomía no es absoluta. Hace poco surgió un nuevo subgrupo de linfocitos con producción preferencial de IL-4, IL-10 y TGFβ, con funciones supresoras fundamentales en la tolerancia periférica y la homeostasis inmune, llamado Th3 o célula T reguladora (6-8). Así mismo, es importante recordar que la clasificación en Th1 y Th2 no es exclusiva para los linfocitos T CD4+ y que los linfocitos T CD8+ también producen citoquinas

Tabla 1. Clasificación funcional de las citoquinas.

Familia	Miembros
Hematopoyéticas	SCF, IL-3, TPO, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Crecimiento y diferenciación	PDGF, EGF, FGF, IGF, TGFβ, VEGF
Inmunorreguladoras	TGFβ, IFNγ, IL-2, 4, 5, 7, 9, 18
Proinflamatorias	IL-1α, IL-1β, TNFα, LT, IL-6, LIF, IL-17
Antiinflamatorias	IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13
Quimiotácticas	IL-8, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, RANTES

EGF: factor de crecimiento epidérmico; EPO: eritropoyetina; FGF: factor de crecimiento del fibroblasto; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; IFN: interferón; IGF: factor de crecimiento insulinoide; IL: interleuquina; IL-1Ra: antagonista del receptor de IL-1; LIF: factor inhibidor de la leucemia; LT: linfotoxina; MCP: proteína quimiotáctica de monocitos; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; MIP: proteína inflamatoria de macrófagos; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; RANTES: proteína expresada normalmente por células T, regulada y secretada bajo activación; SCF: factor de células madre; TGF: factor de crecimiento transformador; TNF: factor de necrosis tumoral; TPO: trombopoyetina; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

que permiten clasificarlos en Th1 o Th2 (5). Los linfocitos T que aún no tienen ningún patrón de producción de citoquinas definido de los antes mencionados se conocen como Th0, los cuales producen altos niveles de IL-2, IFNγ e IL-4 (5).

Citoquinas, enfermedades inflamatorias y autoinmunidad

La mayoría de las citoquinas descritas se han asociado de una manera u otra con diferentes enfermedades inflamatorias y autoimmunidad. Algunos ejemplos de dicha asociación se verán brevemente en esta sección. De una manera muy general en el estudio de autoimmunidad, se ha postulado que citoquinas producidas por células Th1 promueven síndromes que son órgano específicos, por ejemplo diabetes tipo 1 o polimiosotis (9-11), y que, en contraste, citoquinas producidas por células Th2 promueven una enfermedad sistémica como el lupus (12, 13). Evidencia que las citoquinas juegan un papel crítico en autoinmunidad se ha obtenido por los estudios de neutralización del TNFα, donde se tiene un efecto benéfico bastante prominente en pacientes con artritis reumatoide (14).

Obesidad y diabetes

Es cierto que existe una conexión entre la obesidad y el desarrollo de diabetes tipo 2. En diabetes tipo 2, la inhabilidad de los tejidos para responder a la insulina (resistencia), más que la producción baja de insulina es la principal característica (15). Actualmente el tejido adiposo es considerado como una fuente muy importante de citoquinas (el término adipocitoquinas se ha acuñado para describir las citoquinas que el tejido adiposo produce) (15). En los individuos obesos, el tejido adiposo visceral produce abundante niveles de la citoquina TNFα (15). Se ha demostrado que los efectos del TNFα en muchos tejidos son la causa más importante de resistencia a la insulina (15).

Enfermedad coronaria

Varios estudios han mostrado que individuos con un alto riesgo de presentar un ataque cardíaco, normalmente tienen elevados niveles del marcador de inflamación, proteína C reactiva (16). Junto con la proteína C reactiva, los niveles de las citoquinas IL6, y TNFα también parecen estar directamente correlacionadas con el riesgo de un ataque cardíaco (16).

Lupus eritematoso sistémico (LES).

Diversas citoquinas se han relacionado con la patogénesis del LES. Una de las que ha generado mayor interés es el interferón-alfa (IFNα). En algunos subgrupos de pacientes con LES se pueden detectar niveles séricos elevados de IFNα (17, 18). Este IFNα en el suero de pacientes con LES tiene la habilidad de inducir la diferenciación de células que producen más IFNα, que activan linfocitos T (17,18). Se ha postulado que luego de su activación estas promoverían autorreactividad (18).

Quimioquinas

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas de bajo peso molecular que pertenecen a una familia de cerca de 40 miembros distintos, todos ellos relacionados estructuralmente. Las quimioquinas fueron en principio descritas en 1987 con el descubrimiento de CXCL8 (interleuquina 8), seguida del ligando para quimioquina CXC 10 (CXCL 10/IP10) y del ligando de la quimioquina CCR2 (CCL2/MCP1) (19) (Figura 1). Aunque durante el transcurso de la década de los noventa el campo se revolucionó no solamente debido al descubrimiento de nuevos receptores y ligandos, sino también por su clonación y caracterización de su estructura molecular, el acontecimiento que des-

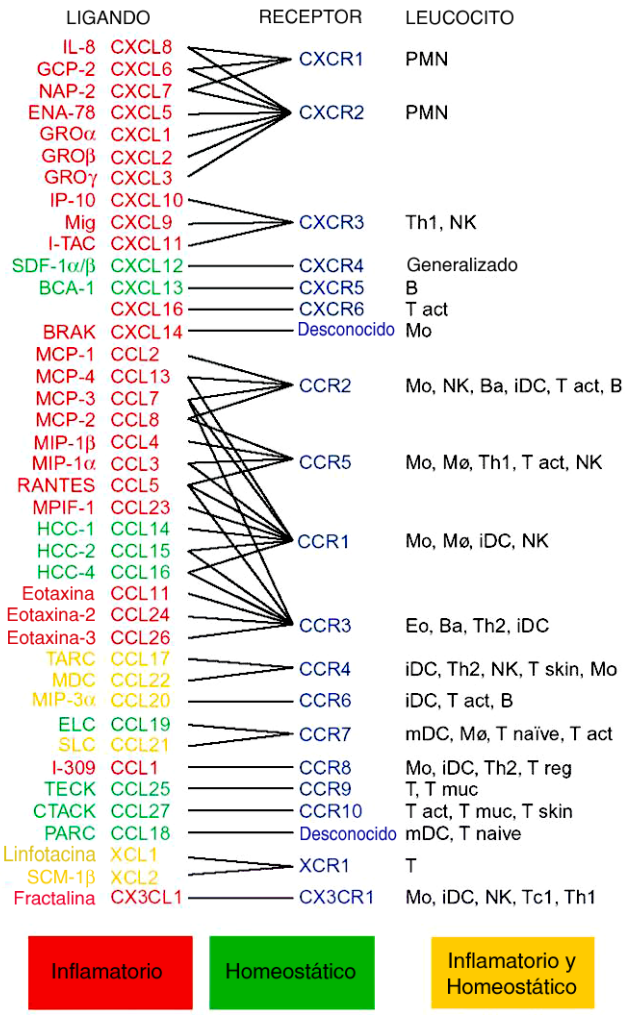


FIGURA 1.
Expresión leucocítica de los receptores de quimioquinas y sus ligandos específicos.
Se listan las diferentes poblaciones de leucocitos y sus dife-rentes repertorios de ligandos y quimioquinas. Los ligandos se identifican con la nomenclatura nueva y antigua. Abreviaturas: PMN, neutrófilos; Eo, eosinófilos; Ba, basófilos; MC, mastocitos; Mo, monocitos; Mø, macrófagos; iDCs, celulas dendríticas inmaduras; mDCs, células dendríticas; T naive, linfocitos T vírgenes; T act, linfocitos T activados; T skin, linfocitos T intraepiteliales; T muc, linfocitos T residentes en mucosa; T reg, linfocitos T reguladores.

TABLA 2. Fuentes celulares y funciones de las citoquinas.

Citoquina	Localización	Fuente celular	Función
IL-1 α y β	2q12-q21 (α) 2q13-q21 (β)	Fagocitos mononucleares activados. También células dendríticas, linfocitos T y B, NK, neutrófilos, células endoteliales y queratinocitos	Aumenta expresión de moléculas de adhesión celular Estimula producción de PGE2, NO y PAF Respuesta de fase aguda Activación de fagocitos Inflamación, fiebre, hipotensión, pérdida de peso Coestimulación de CPAs y linfocitos T Proliferación de linfocitos B Aumenta producción de anticuerpos Hematopoyesis Estimula producción de citoquinas proinflamatorias Activa osteoclastos Estimula producción de cartílago por condorcitos
IL-1Ra	2q14.2	Las mismas de IL-1	Inhibidor competitivo de la IL-1
IL-2	4q26-q27	Células T activadas (principalmente Th1)	En linfocitos T estimula proliferación, síntesis de citoquinas; potencia la apoptosis mediada por Fas En NK activación y proliferación En células B proliferación y síntesis de anticuerpos
IL-3	5q23-q31	Células T CD4+	Factor estimulante de colonias múltiple: promueve la expansión de progenitores inmaduros medulares de todos los tipos de células sanguíneas maduras conocidas
IL-4	5q23-q31	Células T CD4+ Th0, Th2, Th3; mastocitos	En células T estimula respuesta Th2 y proliferación En células B estimula secreción de IgE Estimula proliferación de mastocitos Suprime respuesta Th1
IL-5	5q23-q31	Células T CD4+ Th2, mastocitos	Activador y factor estimulante de colonias de eosinófilos Estimula proliferación de células B y producción de IgA
IL-6	7p15-p21	Células T (principalmente Th2), fagocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos	Estimula síntesis de reactantes de fase aguda Estimula diferenciación de células B a plasmocitos Activa resorción ósea Factor de crecimiento para queratinocitos, células endoteliales y células leucémicas Aumenta glucocorticoides
IL-7	8q12-q13	Células estromales de la médula ósea	Estimula expansión de precursores inmaduros de células T y B
IL-8	4q13-q21	Fagocitos mononucleares, linfocitos T y B, NK, fibroblastos, células endoteliales, neutrófilos, condrocitos, hepatocitos, células mesangiales, queratinocitos	Quimioatrayente para neutrófilos, linfocitos y basófilos Activación y degranulación de neutrófilos Angiogénesis Aumenta permeabilidad vascular
IL-9	5q31-q35	Células T CD4+ Th2	Activador y factor de crecimiento de mastocitos Factor de crecimiento de células T Incrementa la producción de IgE mediada por IL-4 Promueve maduración de eosinófilos en sinergismo con IL-5
IL-10	1q31-q32	Macrófagos activados, células T CD4+ (Th2, Th3) y CD8+, células B, otros (queratinocitos)	Inhibe la producción de IL-12 y TNF por macrófagos activados Inhibe la expresión de coestimuladores y moléculas MHC II en macrófagos Aumenta la producción de IL-1Ra Estimula proliferación de células B *in vitro*
IL-11	19q13.3-q13.4	Células estromales de la médula ósea	Estimula megacariocitopoyesis Estimula expresión de RANKL en osteoblastos
IL-12 α y β	3p12-q13.2 (α) 5q31.1-q33.1 (β)	Fagocitos mononucleares y células dendríticas	Activa células NK Promueve la síntesis de IFNγ por células T y NK Incrementa actividad citolítica de linfocitos citotóxicos y NK Promueve la respuesta Th1
IL-13	5q31	Células T CD4+ Th2 de IgE y mastocitos	Comparte funciones con IL-4, principalmente a nivel de la proliferación de músculo liso bronquial
IL-l4	1p34.3	Células T	Incrementa proliferación de células B activadas (principalmente de memoria) Inhibe síntesis de inmunoglobulinas

Citoquina	Localización	Fuente celular	Función
IL-15	4q31	Fagocitos mononucleares; células endoteliales, fibroblastos	Estimula proliferación de células NK Factor de crecimiento y supervivencia de células T (principalmente CD8+ de memoria)
IL-16	15q26.3	Células epiteliales, mastocitos, linfocitos, macrófagos, fibroblastos, eosinófilos	Quimioatrayente de linfocitos T CD4+, monocitos y eosinófilos Suprime promotor VIH-1 Aumenta expresión del IL-12R y HLA-DR
IL-17 α y β	2q31 (α) 5q32-34 (β)	Células T CD4+ de memoria; neutrófilos	Incrementa resorción osteoclástica Regula el desarrollo de neutrófilos al parecer por incremento en la síntesis de IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1
IL-18	11q22.2-q22.3	Macrófagos principalmente; células dendríticas, condrocitos y osteoblastos	Estimula la producción de IFNγ por células NK y células T Actividad sinérgica con IL-12 Aumenta la expresión de FasL por células T
IL-19	1q32.2	Fagocitos mononucleares activados	Induce apoptosis vía TNFα Induce producción de radicales de oxígeno
IL-20	1q32	¿?	Induce proliferación y diferenciación de queratinocitos
IL-21	4q26-q27	¿?	Proliferación y maduración de las células NK ¿Proliferación de células T y B?
IL-22	12q15	¿?	Induce reactantes de fase aguda
IL-23	12q13.13	Células dendríticas, macrófagos, células T y células endoteliales	Estimula producción de IFNγ por células T Induce proliferación de células T Estimula síntesis de citoquinas proinflamatorias
IL-24	1q32	Células NK y células B	Actividad antitumoral?
IL-25	14q11.2	Linfocitos T CD4+ Th2; células estromales de la médula ósea, mastocitos	Expansión de eosinófilos vía IL-5 Induce producción de IgE y actividad eosinofílica a través de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 Factor de crecimiento linfoide?
IL-26	12q15	Células T	Estimula la expresión de moléculas de superficie y la producción de citoquinas en células endoteliales
IL-27	19p13.3	Fagocitos mononucleares activados, células dendríticas	Induce diferenciación y expansión de células T CD4+ vírgenes, pero no CD4+ de memoria Estimula producción de IFNγ
IL-28 α y β	19q13.13	¿?	¿Actividad antiviral?
IL-29	19q13.13	¿?	¿Actividad antiviral?
IL-30	16p11	¿?	¿?

pertó un verdadero interés en el estudio de las quimioquinas fue el hallazgo que el receptor de la quimioquina CC 5 (CCR5), y el receptor de quimioquina CXC 4 (CXCR4), son requeridos como coreceptores junto con CD4 (receptor), para la entrada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (19).

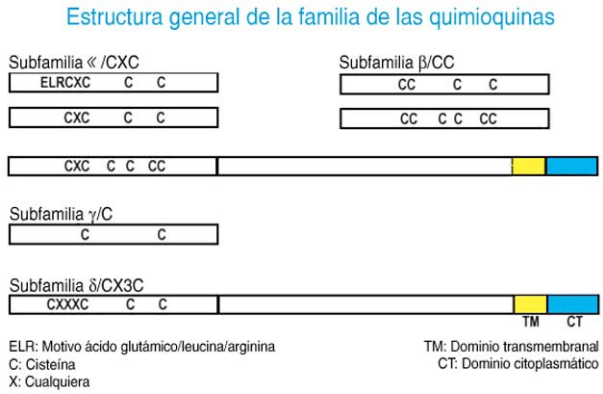


FIGURA 2.
Estructura de las quimioquinas.

Estructura de las quimioquinas

Estructuralmente las quimioquinas se dividen de acuerdo a la presencia de resíduos de cisteína (C) conservados, cercanos al grupo amino (NH_2) terminal en cuatro subfamilias: C, CC, CXC, y CX_3C, donde X puede ser cualquier aminoácido (aa) (20, 21) (Figura 2). Adicionalmente las quimioquinas han sido divididas en dos categorías funcionales: constitutivas (homeostáticas) e inducibles (inflamatorias) (20-22). Las constitutivas son requeridas para la diferenciación celular, tráfico basal hematopoyético, y apropiado desarrollo embrionario. Las inducibles reclutan leucocitos donde la integridad tisular ha sido comprometida, o donde un foco de infección ha sido generado.

Evolución del sistema de las quimioquinas

Las primeras formas de vida identificadas en tener quimioquinas fueron tal vez los invertebrados como *Drosophila spp.* (mosca de la fruta), donde se encontró un homólogo a CXCR4 (22). Evidencia del rol esencial de CXCR4 y su ligando monógamo CXCL12 como quimioquina primordial, se ha encontrado en estudios de deleción génica, don-

de la ausencia del receptor o de su ligando conlleva a muerte prenatal como consecuencia de severos defectos durante la embriogénesis, que impiden la hematopoyesis y la organogénesis (23).

Parece probable que el incremento en la sofisticación del sistema inmune en vertebrados coincidió con la diversificación y expansión en el número de quimioquinas y sus receptores. Procesos como interacciones celulares complejas, presentación antigénica, reclutamiento de tipos celulares específicos, e inducción de tolerancia requerirían de un gran número de diferentes quimioquinas.

Función de las quimioquinas en el sistema inmune

La participación de quimioquinas en el proceso de extravasación leucocitaria es bastante compleja y resulta del reclutamiento de tipos celulares específicos al área de inflamación. Dos factores determinan la especificidad en los efectos de las quimioquinas. Primero, ciertas quimioquinas se expresan con mayor predilección en algunos tejidos, y, segundo, el conjunto de receptores para quimioquinas expresado en diferentes tipos de leucocitos también varía (Tablas 1 y 3).

Tabla 3. Diferentes tipo de familias de quimioquinas y sus receptores.

FAMILIA CXC					
Nombre sistemático	Nombre alternativo (humano)	Nombre alternativo (murino)	Localización cromosómica (humano)	Receptor	Función (receptor)
CXCL1	GROα/MGSAα	GRO/MIP-2/KC?	4q21.1	CXCR2>CXCR1	
CXCL2	GROβ/MGSAβ	GRO/MIP-2/KC?	4q21.1	CXCR2	Migración de neutrófilos; inmunidad innata; inflamación aguda; angiogénesis.
CXCL3	GROγ/MGSAγ	GRO/MIP-2/KC?	4q21.1	CXCR2	
CXCL4	PF4	PF4	4q21.1	Desconocido	
CXCL5	ENA-78	GCP-2/LIX	4q21.1	CXCR2	
CXCL6	GCP-2	GCP-2/LIX	4q21.1	CXCR1,CXCR2	
CXCL7	NAP-2	Desconocido	4q21.1	CXCR2	
CXCL8	IL-8	Desconocido	4q21.1	CXCR1	Migración de neutrófilos; inmunidad innata; inflamación aguda.
CXCL9	Mig	Mig	4q21.1	CXCR3(CD183)	Migración de células Th1; inmunidad adaptativa; respuesta Th1.
CXCL10	IP-10	IP-10	4q21.1	CXCR3(CD183)	
CXCL11	I-TAC	I-TAC	4q21.1	CXCR3(CD183)	
CXCL12	SDF-1	SDF-1/PBSF	10q11.21	CXCR4(CD184)	Desarrollo del sistema nervioso central y vasculatura; mielopoyesis de médula ósea; linfopoyesis células B; infección VIH.
CXCL13	BCA-1	BLC	4q21.1	CXCR5	Desarrollo linfoide; tráfico de células B.
CXCL14	BRAK	BRAK	5q31.1	Desconocido	
(CXCL15)	Desconocido	Lungkine/WECHE	?	Desconocido	
CXCL16	?	?	17p13	CXCR6	Migración de células T.

FAMILIA XC					
Nombre sistemático	Nombre alternativo (humano)	Nombre alternativo (murino)	Localización cromosómica (humano)	Receptor	Función (receptor)
XCL1	Linfotactina/ SCM1α/ATAC	Linfotactina	1q24.2	XCR1	Tráfico células T
XCL2	SCM-1β	Desconocido	1q24.2	XCR1	

FAMILIA CX_3C					
Nombre sistemático	Nombre alternativo (humano)	Nombre alternativo (murino)	Localización cromosómica (humano)	Receptor	Función (receptor)
CX3CL1	Fractalkina	Neurotactina /ABCD-3	16q13	CX3CR1	

FAMILIA CC					
Nombre sistemático	Nombre alternativo (humano)	Nombre alternativo (murino)	Localización cromosómica (humano)	Receptor	Función (receptor)
CCL1	I-309	TCA-3/P500	17q11.2	CCR8	Tráfico de células T.
CCL2	MCP-1/MCAF/	JE? TDCF	17q11.2	CCR2	Migración de células T y monocitos; inmunidad innata y adaptativa; respuesta Th1.
CCL3	MIP-1α/LD78α	MIP-1α	17q12	CCR1, CCR5 (CD195)	
CCL3L1	LD78β	Desconocido	17q12	CCR1, CCR5 (CD195)	
CCL4	MIP-1β	MIP-1β	17q12	CCR5 (CD195)	Migración de células T y monocitos; inmunidad innata y adaptativa; antagonismo de la infección con el VIH.
CCL5	RANTES	RANTES	17q12	CCR1, CCR3, CCR5 (CD195)	
(CCL6)	Desconocido	C10/MRP-1		Desconocido	
CCL7 MCP-3	MCP-3	MARC?	17q11.2	CCR1, CCR2, CCR3	
CCL8	MCP-2	MCP-2?	17q11.2	CCR3, CCR5 (CD195)	
(CCL9/10)	Desconocido	MRP-2/CCF18/ MIP-1γ		CCR1	
CCL11	Eotaxina	Eotaxina	17q11.2	CCR3	Migración de células T, basófilos y eosinófilos; alergia.
(CCL12)	Desconocido	MCP-5		CCR2	
CCL13	MCP-4	Desconocido	17q11.12	CCR2, CCR3	
CCL14	HCC-1	Desconocido	17q12	CCR1, CCR5 (CD195)	
CCL15	HCC-2/Lkn-1/	Desconocido	17q12	CCR1, CCR3	
	MIP-1δ				
CCL16	HCC-4/LEC/ LCC-1	Desconocido	17q12	CCR1, CCR2	
CCL17	TARC	TARC/ABCD-2	16q13	CCR4	Migración de células T y monocitos; alergia.
CCL18	DC-CK1/PARC/ AMAC-1	Desconocido	17q12	Desconocido	
CCL19	MIP-3β/ELC/ exodus-3	MIP-3β/ELC/ exodus-	9p13.3	CCR7 (CD_w197)	Migración de células T y dendríticas; desarrollo linfoide; respuesta inmune primaria.
CCL20	MIP-3α/LARC/ exodus-1	MIP-3α/LARC/ exodus-1	2q36.3	CCR6	Migración de células dendríticas.
CCL21	6Ckine/SLC/ exodus-2	6Ckine/SLC/ exodus-2/TCA-4	9p13.3	CCR7 (CD_w197)	
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	16q13	CCR4	
CCL23	MPIF-1/CKβ8/ CKβ8-1	Desconocido	17q12	CCR1	Migración de células T y monocitos; inmunidad innata y adaptativa; inflamación.
CCL24	Eotaxina-2/MPIF-2	MPIF-2	7q11.23	CCR3	
CCL25	TECK	TECK	19p13.3	CCR9	Migración de células T a la mucosa intestinal y tejido linfoide asociado a las mucosas.
CCL26	Eotaxina-3	Desconocido	7q11.23	CCR3	
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC/ ESkine	9p13.3	CCR10	Células T que migran a la piel.
CCL28	MEC	?	5p12	CCR3/CCR10	

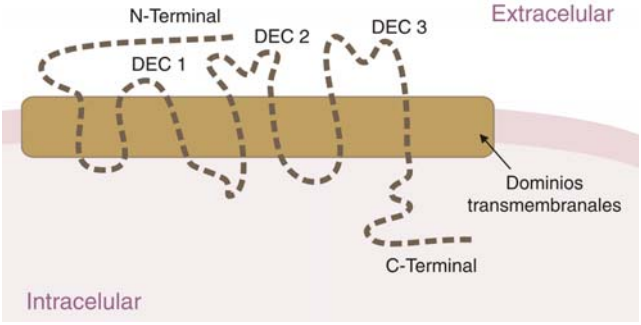
Las quimioquinas trabajan en conjunto con otras moléculas tales como las selectinas e integrinas para promover el reclutamiento de leucocitos (20, 24). Varios eventos contribuyen a la migración leucocitos a las áreas de inflamación. El primer evento consiste en el contacto inicial entre el endotelio activado y los leucocitos por medio de selectinas. Estas moléculas también permiten el deslizamiento de los leucocitos en la superficie del endotelio. Consecutivamente los leucocitos se adhieren fijamente en el endotelio gracias a la presencia de integrinas en su membrana (por ejemplo, LFA-1, Mac-1, CD11c/CD18 y CD 49d/CD29). Las quimioquinas están íntimamente involucradas en este proceso ya que inducen un cambio conformacional en las integrinas (activación) permitiendo su unión con las selectinas (20, 25).

Una vez los leucocitos han sido retenidos firmemente en la pared endotelial, éstos comienzan su migración transendotelial hasta su blanco tisular (20). En el proceso de migración a los tejidos inflamados los leucocitos presentes en los vasos sanguíneos quizás siguen un gradiente de quimioquinas originado desde el sitio del daño tisular (mayor concentración), hasta el endotelio activado (menor concentración) (Figura 3). Es importante mencionar que las quimioquinas producidas en los tejidos se unen a los glucosaminoglicanos presentes en la superficie endotelial (26). Por último, es de destacar que concentraciones de quimioquinas muy altas pueden repeler, más que atraer leucocitos (27).

Estructura de los receptores de las quimioquinas y señalización intracelular

La actividad de las quimioquinas parte de la unión a su receptor. Los receptores de quimioquinas traducen señales por medio de proteínas G (28). Los receptores de quimioquinas tienen en la porción extracelular una región N-terminal y tres dominios extracelulares (DEC), los cuales son importantes en la unión y reconocimiento a sus ligandos (quimioquinas); y en la porción citoplasmática posee una región C-terminal, la cual está comprometida en la señalización intracelular que conduce a diversos efectos incluyendo expresión génica, polarización celular y quimiotaxis (28) (Figura 4).

Figura 4.
Estructura de los receptores de las quimioquinas.



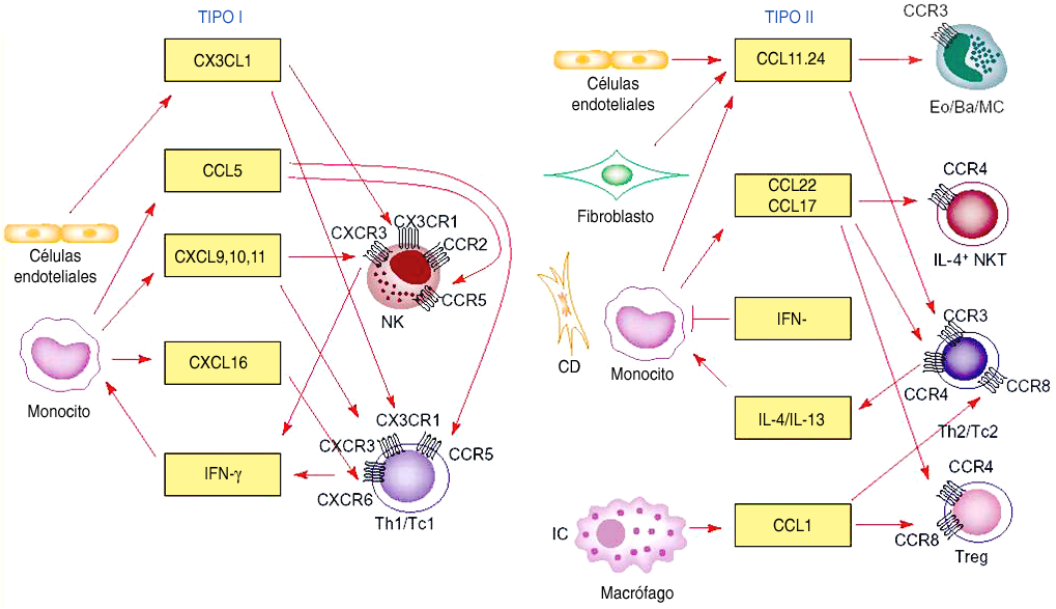


Figura 3.
Instalación de polarización de los receptores de quimioquinas y quimioquinas.
Visión simplificada de las quimioquinas en función de la respuesta linfocitaria tipo I y tipo II. Las principales citoquinas regulan la producción de quimioquinas a través de las células estromales e inflamatorias. Las quimioquinas favorecen el reclutamiento selectivo de las células T polarizadas, del tipo específico I y del tipo II celular efector, las cuales expresan paneles diferentes de receptores de quimioquinas. Regularmente, los receptores CCR3 CCR4 y CCR8 del grupo de quimioquinas CC, se han asociado con un fenotipo tipo II, mientras que CXCR3 y CCR5 se expresan preferencialmente con células de T tipo I. Los ligandos CCR3 también atraen a basófilos y eosinófilos, crucial para el tipo polarizado de respuesta tipo II. Aunque diferencialmente expresados, los receptores de quimioquinas no son marcadores para las células de T polarizadas, no existe una asociación absoluta entre la expresión de los receptores de quimioquinas y el repertorio de citoquinas de las poblaciones polarizadas de las células T. Por ejemplo, CCR4, es expresado a niveles más altos en el tipo polarizado células tipo II, se expresa también en poblaciones no polarizadas de la células T, y se induce en el tipo I después de la activación. Abreviaturas: DC, células dendríticas; Ba, basófilos; Eo, eosinófilos; MC, mastocitos; Treg, células T reguladoras; IC, complejos inmunes.

Además de mediar señales por medio de proteínas G, los receptores de quimioquinas también activan otras cascadas intracelulares tales como algunos de los factores de transcripción conocidos como STATs ("*Signal transducers and activators of transcription*") por medio de la inducción de la fosforilación de Janus Kinasas (JAK) que están normalmente asociadas al receptor (28).

Papel de las quimioquinas en diferentes enfermedades

A continuación se presenta un bosquejo muy corto de algunas enfermedades en las cuales se ha estudiado la contribución de las quimioquinas o sus receptores (Figura 5). Ya que las quimioquinas son indispensables para migración de los leucocitos a las áreas de inflamación, es de esperarse que estas moléculas sean claves en todo tipo de enfermedades en las cuales la inflamación es un factor determinante. Evidencia que apoya a esta hipótesis ha sido obtenida a varios niveles: 1. la presencia de quimioquinas y de sus receptores se ha documentado en diferentes enfermedades inflamatorias tales como las artritis reumatoide y asma (estudios de tipo descriptivo); 2. estudios de la variación genética (y su correlación funcional) en los genes que codifican quimioquinas o sus receptores han evidenciado que en algunos individuos algunas de estas moléculas no se expresan o se expresan a niveles diferentes (más altos o bajos) o que algunos de los receptores tienen una mayor tendencia a formar heterodímeros u homodímeros. Estas variaciones genéticas normales se han asociado con diferencias en la severidad de distintas enfermedades inflamatorias (estudios de asociación); 3. usando modelos animales de enfermedades inflamatorias humanas, junto con ratones a los cuales se les ha removido genes para quimioquinas o sus receptores (ratones "knockout"), anticuerpos neutralizantes u otro tipo de antagonistas; varios laboratorios han demostrado que las quimioquinas son muy importantes en diferentes procesos inflamatorios (estudios experimentales). En general, la mayoría de los estudios descritos parecen sugerir que la manipulación del sistema de las quimioquinas puede constituirse en una terapia alternativa de gran valor.

Iniciación de la respuesta inmune

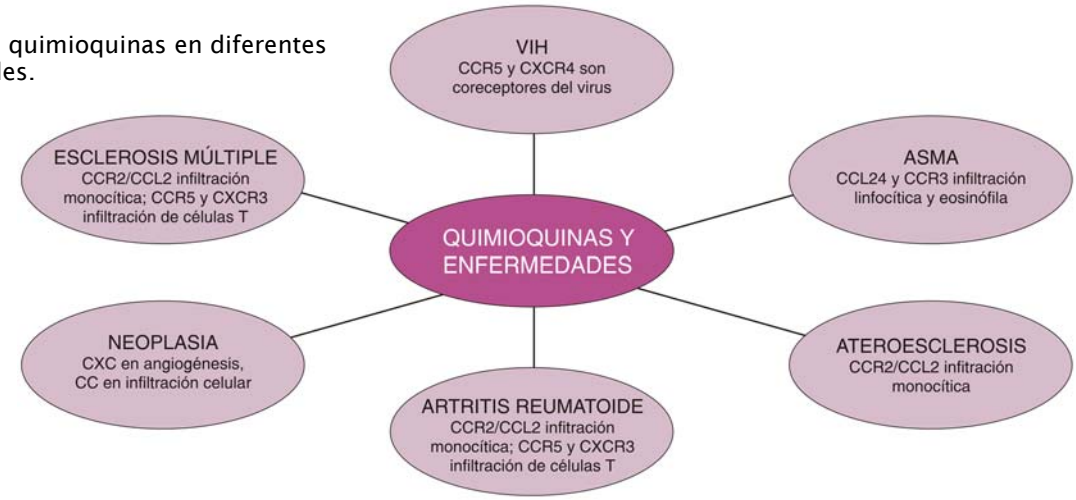
Se ha demostrado que las quimioquinas son responsables de mediar las interacciones entre células T- antígeno específicas, y células presentadoras de antígeno en los órganos linfoides como los nódulos linfáticos (29). En este caso, ambos tipos de células expresan el mismo tipo de receptores para quimioquinas llamado CCR7, y los ligandos para este receptor se expresan en el tejido linfoide. Así mismo, cuando las células migran, están obligadas a estar en el tejido linfoide. Últimamente se hecho más notorio el hecho que no todas las células T migran al tejido linfoide. Cuando una célula T es virgen expresa altos niveles de CCR7 (29). Una vez activada, si se diferencia en una célula efectora, esta célula pierde la expresión de CCR7 y por lo tanto migra sólo en la periferia, pero sí se diferencia en una célula T de memoria y mantiene la expresión de CCR7, se convierte en una célula T de memoria central que está lista en el tejido linfoide para responder a antígenos exhibidos por las presentadoras de antígeno (29). Las células efectoras también pueden dar origen a células T de memoria que no expresan CCR7, y que se mantienen en la periferia (29).

VIH y otras enfermedades infecciosas

CD4 el receptor del VIH y CXCR4/CCR5 actúan como correceptores (30, 31). Receptores y correceptores son necesarios para la entrada del virus en los linfocitos T ayudadores y macrófagos. La evidencia más contundente que el CCR5 es uno de los correceptores indispensables para la infección con el VIH, es la demostración que la mayoría de individuos expuestos al virus y resistentes a la infección, son homocígotos para una mutación en el gen de CCR5 conocida como Δ32 (32). Esta mutación conlleva a la ausencia de CCR5 en la superficie celular. *In vitro*, las células de individuos Δ32 son completamente resistentes a la infección con el VIH (33). También es importante mencionar que las quimioquinas que usan CCR5 como CCL5 y CCL3 antagonizan la entrada del virus a las células (31).

Otros receptores para quimioquinas son utilizados para la entrada de patógenos o como receptores para sus com-

FIGURA 5.
Papel de las quimioquinas en diferentes enfermedades.


QUIMIOQUINAS Y ENFERMEDADES
VIH
CCR5 y CXCR4 son coreceptores del virus
ESCLEROSIS MÚLTIPLE
CCR2/CCL2 infiltración monocítica; CCR5 y CXCR3 infiltración de células T
ASMA
CCL24 y CCR3 infiltración linfocítica y eosinófila
NEOPLASIA
CXC en angiogénesis, CC en infiltración celular
ATEROESCLEROSIS
CCR2/CCL2 infiltración monocítica
ARTRITIS REUMATOIDE
CCR2/CCL2 infiltración monocítica; CCR5 y CXCR3 infiltración de células T

ponentes antigénicos. Por ejemplo, un receptor para quimioquinas conocido como el antígeno Duffy (DARC), sirve como receptor para el *Plasmodium vivax (34)*. La ausencia de DARC en la superficie de reticulocitos se asocia con una protección completa contra la infección en individuos que normalmente no expresan esta proteína en la superficie de sus células (34). Otro caso interesante es el de ciertos antígenos del *Toxoplasma gondii* que usan CCR5 como receptor e inducen la activación celular en células del huésped (35, 36).

Asma

La patogénesis del asma está asociada con una respuesta de linfocitos Th2 y eosinófilos junto con mastocitos y basófilos que migran a la mucosa bronquial en respuesta a diferentes quimioquinas (37). En las secreciones bronquiales de pacientes con asma se pueden medir niveles elevados de varias quimioquinas y los leucocitos en la mucosa y secreciones bronquiales expresan receptores para quimioquinas (38). Usando modelos animales se ha demostrado que las quimioquinas CCL11, CCL5 y CCL2 contribuyen a la sensibilización de la vía aérea y a la migración celular a la mucosa bronquial (39). También se ha visto que en individuos con la mutación Δ32 en CCR5 parecen menos susceptibles a desarrollar asma (40, 41), aunque como sucede con estudios de asociación, esta observación es controversial, ya que no se ha reproducido en otros estudios (42) (esta afirmación también se debe tener en cuenta en el análisis de los estudios relacionados con artritis reumatoide, y esclerosis múltiple).

Ya que los eosinófilos son muy importantes en el asma, las quimioquinas que específicamente reclutan este tipo de células, por ejemplo, CCL24 y su receptor CCR3, parecen desempeñar una función muy importante. Por ejemplo, usando un modelo de asma en ratones, se ha corroborado que ratones deficientes de CCR3 (CCR3 knockouts) desarrollan menos hipereactividad e inflamación en la vía aérea (37).

Artritis reumatoide

Una gran cantidad de información sugiere que las quimioquinas están comprometidas en el daño tisular en la artritis reumatoide (AR). *Primero*, en el líquido y membrana sinovial de pacientes con AR se han encontrado niveles elevados de varias quimioquinas tales como CCL2, CCL4, CXCL8, CXCL10 y CCL5 (43, 44). Además, los receptores para estas quimioquinas, en particular CCR5 y CXCR3, se expresan copiosamente en los linfocitos Th1 presentes en las articulaciones comprometidas (45, 46). *Segundo*, individuos con la mutación Δ32 en CCR5 parecen tener formas menos severas de AR por lo regular son seronegativas para el factor reumatoide (47). *Tercero*, en diferentes modelos animales de la AR se ha demostrado que el bloqueo de quimioquinas, como CCL2 o CCL5 disminuye la severidad de la enfermedad al reducir la acumulación de monocitos y células T en las articulaciones (48-50).

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neuroinflamatoria crónica en la cual los linfocitos T y macrófagos infiltran el sistema nervioso central y causan pérdida gradual de la mielina. Varias quimioquinas parecen estar involucradas en la patogénesis de la EM. Por ejemplo, los pacientes con EM tienen altos niveles en el líquido cefalorraquídeo de quimioquinas como CCL3, CXCL10, CXCL9 y CCL5 (51). La presencia de otras quimioquinas como CCL2 también se ha documentado en el parénquima cerebral en autopsias de pacientes con EM (51). Los receptores para estas quimioquinas están presentes en los leucocitos del líquido cefalorraquídeo, y también en los que infiltran el parénquima cerebral (51). Evidencia experimental de la importancia de las quimioquinas en EM se ha obtenido usando modelos animales (52). Por ejemplo, la ausencia de CCL2 o su receptor CCR2 protege casi en un100% contra la inducción de la enfermedad (53, 54).

Neoplasia

Las quimioquinas parecen estar implicadas en varios procesos relacionados con promoción del crecimiento tumoral y su diseminación (55). Por un lado, algunas quimioquinas tienen actividad angiogénica (proliferación de nuevos vasos sanguíneos) promoviendo irrigación vascular, y por lo tanto crecimiento de ciertos tipos de cáncer (56). Al mismo tiempo, las quimioquinas promueven la infiltración leucocitaria del tumor (55). Estos leucocitos podrían facilitar la respuesta inmune contra el tumor y así mismo su erradicación (55). Finalmente, las quimioquinas y sus receptores son requeridos para la diseminación tumoral (57, 58). En este caso, la transformación maligna da lugar a la expresión de ciertos receptores de quimioquinas en las células neoplásicas, y estos receptores promueven su migración a órganos en los cuales se expresan sus ligados (57, 58).

El rol de las quimioquinas en malignidad es importante y complejo. El cáncer de mama en mujeres con la mutación Δ32 en CCR5 tiene un curso más acelerado (59).

Arterosclerosis

El desarrollo de la placa aterosclerótica comienza con una respuesta inflamatoria secundaria al daño endotelial que ocurre debido a hipercolesterolemia, hipertensión, flujo turbulento de sangre, entre otros factores. El proceso de migración leucocitaria, a la pared arterial es mediado en gran parte por quimioquinas (60). En placas ateroscleróticas humanas se ha documentado la presencia de varias quimioquinas y sus receptores (60). En modelos de arteriosclerosis en ratones se ha demostrado que la ausencia de varios miembros del sistema de quimioquinas (60), en particular CCL2 o CCR2 disminuye el tamaño de las lesiones arterioscleróticas (61, 62).

Más información en la web

En este momento existen varias páginas web de libre acceso en las cuales se puede encontrar información más

detallada acerca de muchas de las cito/quimioquinas que se han descubierto hasta la fecha. Dos de las paginas web más completas y actualizadas son "*Cytokines Online PathfinderEncyclopaedia-COPE"http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi* y http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/

Agradecimientos

Los autores agradecen el firme y continuo apoyo de la Dra. Seema Ahuja y el Dr. Sunil Ahuja.

Referencias

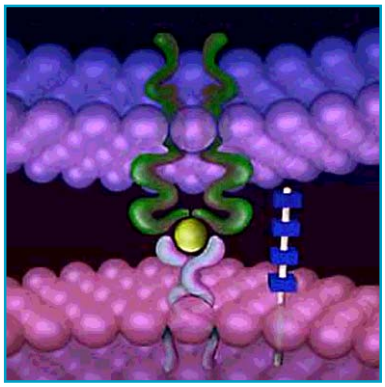
1. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today 1999. 20:254-257
2. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, and Imai T Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004. 24:34-40
3. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, and Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. Nat Immunol 2003. 4:78-86
4. O'Garra A, and Robinson D. Development and function of T helper 1 cells. Adv Immunol 2004. 83:133-162
5. Mosmann TR and Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996.17:138-146
6. Cottrez F, and Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+) CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. Transplantation 2004. 77:S12-15
7. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. Microbes Infect 2001. 3:947-954
8. Gavin M, and Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+T cells. Curr Opin Immunol 2003.15:690-696
9. Liblau RS, Singer SM, and McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immunol Today 1995.16:34-38
10. Rocken M, Racke M, and Shevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. Immunol Today 1996. 17:225-231
11. Trembleau S, Germann T, Gately MK and Adorini L. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. Immunol Today 1995.16:383-386
12. Mok CC, and Lau, CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Pathol 2003. 56:481-490
13. Singh RR. IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity. Clin Immunol 2003.108:73-79
14. Feldmann M, Brennan FM, Paleolog, E, et al. Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid arthritis: what can we learn about chronic disease? Novartis Found Symp 2004.256:53-69; discussion 69-73, 106-111, 266-109
15. Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. Endocrine 2004. 23:177-182
16. Blake GJ, and Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol 2003. 41:37S-42S
17. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, and Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. Science 2001. 294:1540-1543
18. Banchereau J, Pascual V, and Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. Immunity 2004. 20:539-550
19. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. Nat Immunol 2001. 2:95-101
20. Rot A, and Von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol 2004.22:891-928
21. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. Pharmacol Rev 2002. 54:227-229
22. Gerard C and Rollins BJ. Chemokines and disease. Nat Immunol 2001. 2:108-115
23. Youn BS, Mantel C and Broxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. Immunol Rev 2000. 177:150-174
24. Campbell JJ and Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. Curr Opin Immunol 2000.12:336-341
25. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 1998. 279:381-384
26. Gilat D, Hershkoviz R, Mekori YA, et al. Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. J Immunol 1994.153:4899-4906
27. Poznansky MC, Olszak IT, Foxall R, et al. Active movement of T cells away from a chemokine. Nat Med 2000. 6:543-548
28. Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Manes S and Martínez AC. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. Annu Rev Immunol 2001.19:397-421
29. Sallusto F and Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. Immunol Rev 2000. 177:134-140
30. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science 1996. 272:872-877
31. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. Science 1996. 272:1955-1958
32. Michael NL, Chang G, Louie LG, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med 1997. 3:338-340
33. Rana S, Besson G, Cook DG, Rucker J, et al. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. J Virol 1997.71:3219-3227
34. Horuk R, Martin A, Hesselgesser J, et al. The Duffy antigen receptor for chemokines: structural analysis and expression in the brain. J Leukoc Biol 1996.59:29-38
35. Aliberti J, Reis Sousa C, Schito M, et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol 2000.1:83-87
36. Golding H, Alberti J, King LR, Manischewitz J, et al. Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from Toxoplasma gondii. Blood 2003. 102:3280-3286
37. Humbles AA, Lu B, Friend DS, et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. Proc Natl Acad Sci 2002.U S A 99:1479-1484
38. Panina-Bordignon P and D'Ambrosio D. Chemokines and their receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med 2003.9:104-110
39. Lloyd CM and Rankin SM. Chemokines in allergic airway disease. Curr Opin Pharmacol 2003.3:443-448
40. Hall IP, Wheatley A, Christie G, et al. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. Lancet 1999. 354:1264-1265
41. Srivastava P, Helms PJ, Stewart D, Main M and Russell, G. Association of CCR5Delta32 with reduced risk of childhood but not adult asthma. Thorax 2003. 58:222-226
42. Mitchell TJ, Walley AJ, Pease JE, et al. Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. Lancet 2000. 356:1491-1492
43. Shadidi KR, Aarvak T, Henriksen JE, et al. The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of Th1 cells into rheumatoid synovial tissue. Scand J Immunol 2003. 57:192-198
44. Haringman JJ and Tak PP. Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? Arthritis Res Ther 2004.6:93-97
45. Ruth JH, Rottman JB, Katschke KJ, et al. Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. Arthritis Rheum 2001. 44:2750-2760

46. Mack M, Bruhl H, Gruber R, et al. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. Arthritis Rheum 1999.42:981-988
47. Zapico I, Coto E, Rodríguez A, Álvarez C, et al. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. Genes Immun 2000. 1:288-289
48. Schrier DJ, Schimmer RC, et al. Role of chemokines and cytokines in a reactivation model of arthritis in rats induced by injection with streptococcal cell walls. J Leukoc Biol 1998.63:359-363
49. Barnes DA, Tse J, Kaufhold M, Owen M, et al. Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. J Clin Invest 1998.101:2910-2919
50. Youssef S, Maor G, Wildbaum G, Grabie N, Gour-Lavie A and Karin N. C-C chemokine-encoding DNA vaccines enhance breakdown of tolerance to their gene products and treat ongoing adjuvant arthritis. J Clin Invest 2000. 106:361-371
51. Trebst C and Ransohoff RM. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. Arch Neurol 2001. 8:1975-1980
52. Karpus WJ and Ransohoff RM. Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. J Immunol 1998. 161:2667-2671
53. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA and Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 2000.192:899-905
54. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ and Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 2001.193:713-726
55. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer 2004. 4:540-550
56. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ and Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. Semin Cancer Biol 2004. 14:195-200
57. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 2001.410:50-56
58. Liotta LA. An attractive force in metastasis. Nature 2001. 410:24-25
59. Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. J Exp Med 2003. 198:1381-1389
60. Bursill CA, Channon KM and Greaves DR. The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. Curr Opin Lipidol 2004.15:145-149
61. Boring L, Gosling J, Cleary M and Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature 1998. 394:894-897
62. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. J Clin Invest 1999.103:773-778

12

MHC, PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Paula A. Correa
Luis Miguel Gómez
John Castiblanco
Juan-Manuel Anaya



El complejo mayor de histocompatibilidad, es un sistema de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, cuya existencia y función se ha conservado durante la evolución, lo que denota su importante papel. Se caracteriza por ser altamente polimórfico y poligénico y su patrón de herencia es mendeliano. El MHC codifica para proteínas asociadas con la inmunidad adquirida y participa directa o indirectamente en el procesamiento de péptidos y en la presentación antigénica. Este sistema es estrictamente regulado a nivel genético y sus componentes principales son las moléculas HLA de clase I y clase II, las cuales participan en la presentación de péptidos tanto intracelulares como extracelulares, respectivamente. Las moléculas HLA de clase I se expresan en la superficie celular de todas las células nucleadas humanas y presentan péptidos a los linfocitos T CD8+, mientras que las moléculas HLA clase II se encuentran expresadas constitutivamente en las células presentadoras de antígenos, aunque puedan ser inducidas en otros tipos de células, y su función primordial es la presentación de péptidos a las células T CD4+. La presentación antigénica por parte de las moléculas es llevada a cabo por varías vías, denominadas vía endógena, vía exógena y presentación cruzada. En este capítulo se discutirán las características genéticas, proteicas y funcionales tanto del MHC como de las moléculas de clase I y clase II.

Contenido

Historia
Origen y evolución del MHC
Características del MHC
Estructura y función de las moléculas MHC
Características de los péptidos presentados en el contexto MHC
Estructura genética del MHC
Regulación génica
Biosíntesis y moléculas chaperonas
Procesamiento y presentación antigénica
Molécula CD1 y presentación de antígenos no proteicos

Historia del MHC

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC del inglés Major histocompatibility complex) fue descubierto en principio como un locus genético, de cuyos productos dependía el proceso de aceptación o rechazo de transplantes en ratones. Años más tarde, en 1954, se halló el mismo sistema genético en humanos y recibió el nombre de antígenos de los leucocitos humanos (HLA del inglés human leukocyte antigen). Este hallazgo, en 1954, se hizo gracias a la presencia de anticuerpos en individuos transfundidos o mujeres multíparas, al igual que en procesos de rechazo de transplantes, dirigidos contra antígenos expresados en los leucocitos y fue planteado por Jean Dausset y Jan van Rood. Se planteó la posibilidad de que estas moléculas de los leucocitos se originarán de genes polimórficos, cuyo producto permitía diferenciar lo propio de lo no propio. Reuniones internacionales de trabajo sobre estas moléculas permitieron avanzar rápidamente en su estudio molecular y se planteó que correspondían a un conjunto de genes ubicados en el cromosoma 6 y que se expresaban en los leucocitos humanos, de ahí su denominación. Este conocimiento condujo a la práctica de tipificación serológica de las diferentes variantes HLA previa a la realización de transplantes, tanto en pacientes como en donantes. Este sistema revolucionó la práctica del transplante y estudios posteriores, permitieron establecer su importancia en la asociación con diferentes enfermedades, la aplicación en el estudio de la genética de poblaciones y la generación de pruebas moleculares y medicina genómica, enfocadas en el MHC.

Origen y evolución del MHC

La inmunidad adquirida y por ende la presentación antigénica en el contexto del MHC se origina a partir de los vertebrados más inferiores. Este tipo de inmunidad quizás tiene un ancestro común y se conserva evolutivamente, lo cual puede verificarse no sólo a nivel funcional sino también genético. El MHC parece haber emergido en algún momento de la historia evolutiva de los vertebrados, a pesar de que el ancestro común de los anfiloxus y los vertebrados no posee inmunidad adquirida ni MHC (Figura 1). El MHC es un sistema genético ordenado, en el que las moléculas que lo conforman funcionan a manera de cascada biológica, con un estricto control para su expresión y función. Este control involucra la acción de algunas moléculas chaperonas, que a pesar de su estrecha relación con la función del MHC no se encuentran ubicadas dentro de este complejo de genes. En la mayoría de los casos el MHC contiene genes que codifican proteínas cuya función está estrechamente relacionada entre sí; este agrupamiento sugiere una presión de selección positiva que indujo la unión de subgrupos de genes, seguida de una presión de selección conservativa que evita la separación de los loci dentro de este sistema.

La evolución de la región genómica del MHC se ha explicado como un proceso de duplicación cromosómica a larga escala, de fragmentos genómicos de los vertebrados, similares en constitución y función al MHC. Análisis filogenéticos sugieren que esta duplicación se generó en una misma ventana de tiempo, tal vez de un ancestro poliploide. Esta hipótesis fue planteada por Kasahara y colaboradores, después de descubrir que el genoma humano contiene al menos tres regiones parálogas, similares al MHC, definidas como "regiones de pares duplicados". Estas regiones de pares duplicados están ubicadas en los cromosomas 1, 9 y 19 en el humano. Estos autores definieron la región clase III como la más ancestral, seguida de la región clase I del MHC y por último la clase II (Figura 2).

La duplicación genética que originó el MHC, parece haber tenido algún efecto sobre la función de este complejo, ya que los genes catalogados como más ancestrales (C3/C4/C5/TNF), adquirieron una función tanto en la inmunidad innata como la adquirida, mientras que los genes involucrados en presentación antigénica (HLA-A, B, C, DR, DQ, DP), parecen haberse generado en un período más reciente de la ventana de duplicación y entraron a formar parte del juego de la inmunidad adquirida,

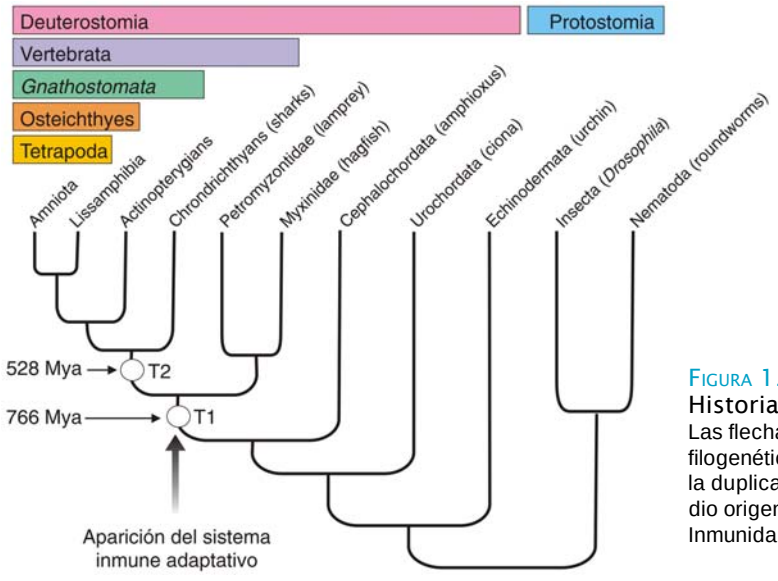


FIGURA 1.
Historia evolutiva del MHC. Las flechas indican el momento filogenético en el que pudo ocurrir la duplicación cromosómica que dio origen al MHC y con él a la Inmunidad Adquirida.

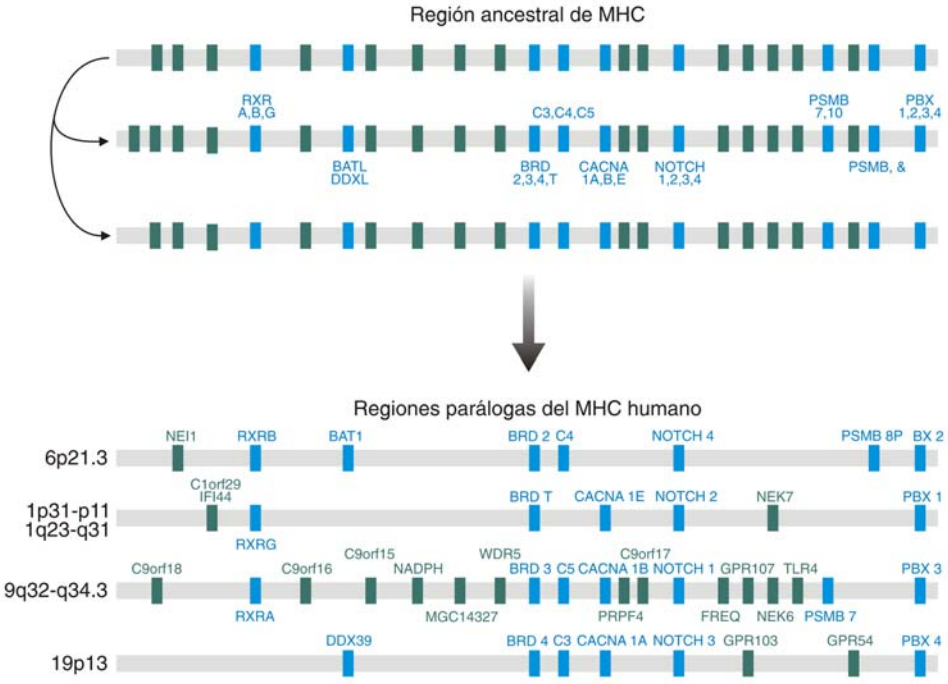


FIGURA 2.
Evolución del MHC.
"Regiones de pares duplicados". La hipótesis de proto-MHC, sugiere la duplicación de regiones cromosómicas, entre los cromosomas 1, 9 y 19 en el humano. (Adaptada ref.2)

que sólo aparece en la evolución tardía del sistema inmunológico, con la aparición de la inmunidad adaptativa.

Características del MHC

El MHC es un complejo de genes cuyos productos moleculares han sido estudiados en forma extensa, tanto en el ratón como en el humano. Este sistema está conformado básicamente por tres regiones. La región clase I que corresponde a los genes que codifican para las moléculas HLA-A, B y C entre otros, la región Clase II de la cual hacen parte los genes HLA-DR, DQ y DP y la región clase III, en la cual se encuentran presentes genes del sistema del complemento y genes de la familia TNF.

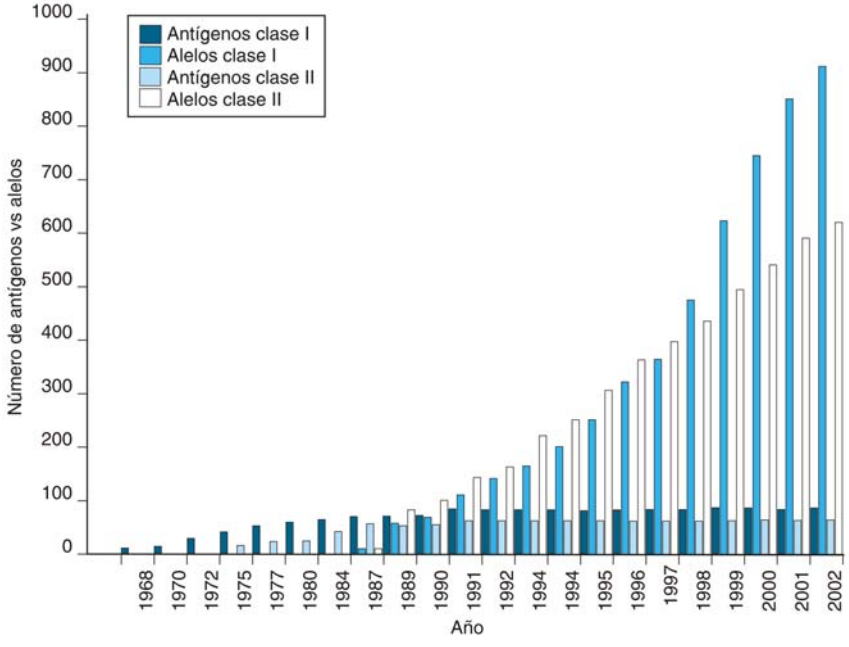
Polimorfismo

El MHC comprende el grupo de genes más polimórfico de todo el genoma humano y como se discutió antes ha permanecido a lo largo de la evolución. Actualmente se han identificado más de 250 genes, entre los cuales suman un total de 1.815 alelos; No obstante, muchos de estos polimorfismos no representan variaciones moleculares, por lo cual en el campo serológico, las especificidades no son tan variables (Figura 3).

Codominancia

Los genes del MHC se heredan de forma codominante, y se expresan en cada individuo los genes heredados de

FIGURA 3.
Antígenos vs alelos.
El número de alelos MHC clase I y clase II, va en aumento aunque las especificidades antigénicas no varíen en razón de las variantes alélicas (Adaptado de EMBT manual, 2004)



ambos padres. La expresión de las moléculas HLA tanto de clase I como de clase II, en la superficie celular, tienen un número definido, que va entre 12 y 16 moléculas, distribuidas así: 2 moléculas HLA-A, 2 HLA-B, 2 HLA-C, 2 HLA-DQ, 2 HLA-DP y entre 2 y 6 moléculas HLA-DR, la mitad de las cuales proviene del padre y la mitad restante de la madre (Figura 4).

Desequilibrio de ligamiento

Otra de las características del MHC es la de generar haplotipos extendidos. Debido a la proximidad de los genes, en este complejo se dan asociaciones preferenciales entre los diferentes loci, heredándose en bloque, con una probabilidad mayor que la que tiene cualquier otro grupo de genes, explicada por el azar, lo cual disminuye la probabilidad de recombinación entre loci y es conocido como desequilibrio de ligamiento (Capítulo 17).

Estructura y función de las moléculas MHC clase I y clase II

Los análisis de estructuras cristalográficas de las moléculas MHC han permitido establecer su estructura, mientras que los estudios funcionales, cada vez resuelven mejor la actividad biológica e inmunológica del MHC y en particular de las moléculas HLA.

Estructura

Cada molécula MHC está conformada por una porción extracelular que corresponde a la cavidad de unión de péptidos, seguida de un par de dominios de tipo inmunoglobulina, anclados a la membrana celular y un dominio intracitoplasmático.

Las moléculas HLA clase I están conformadas por una cadena α polipeptídica de 47 KD codificada por un gen perteneciente al MHC, la cual se une de forma no covalente a una cadena liviana de 12 KD denominada β2-microglobulina, la cual se codifica por un gen presente en el cromosoma 15 en humanos. Cada cadena α está conformada por un fragmento hidrofóbico (C-terminal) expandido al interior de la membrana celular, mientras que el otro extremo N-terminal conforma los dominios α1 y α2 que constituyen la fosa de anclaje para los péptidos, cada uno con una extensión aproximada de 90 residuos; esta fosa está cerrada en su base por hélices β, que aseguran que los péptidos encajen completamente en su porción media, mientras que los extremos del péptido quedan libres. Igualmente, la cadena α posee un tercer dominio denominado α3, el cual tiene características de tipo inmunoglobulina y participa en el contacto entre las moléculas de clase I y el CD8 presente en el linfocito T; este dominio se extiende aproximadamente 25 aminoácidos, conformando la porción hidrofóbica de la cadena, la cual atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática y es seguida por cerca de 30 aminoácidos más que se ubican en el citoplasma, sirviéndole de anclaje a la molécula. Los residuos polimórficos de las moléculas de clase I están limitados al dominio α1 y α2, en respuesta a la variedad de péptidos que deben ser presentados por estas moléculas. La β2-microglobulina se comporta como el cuarto dominio en las moléculas de clase I, ésta se une de forma no covalente al dominio α3 de la cadena pesada y es estructuralmente homóloga con los dominios de Ig; este dominio es invariable y no es polimórfico (Figura 5).

La molécula HLA clase I completamente ensamblada es un heterodímero, conformado por la cadena α, la β2 microglobulina y el péptido que va a ser presentado al linfocito T CD8+. La expresión de estas moléculas en la superficie celular, y su estabilidad, dependerán entonces

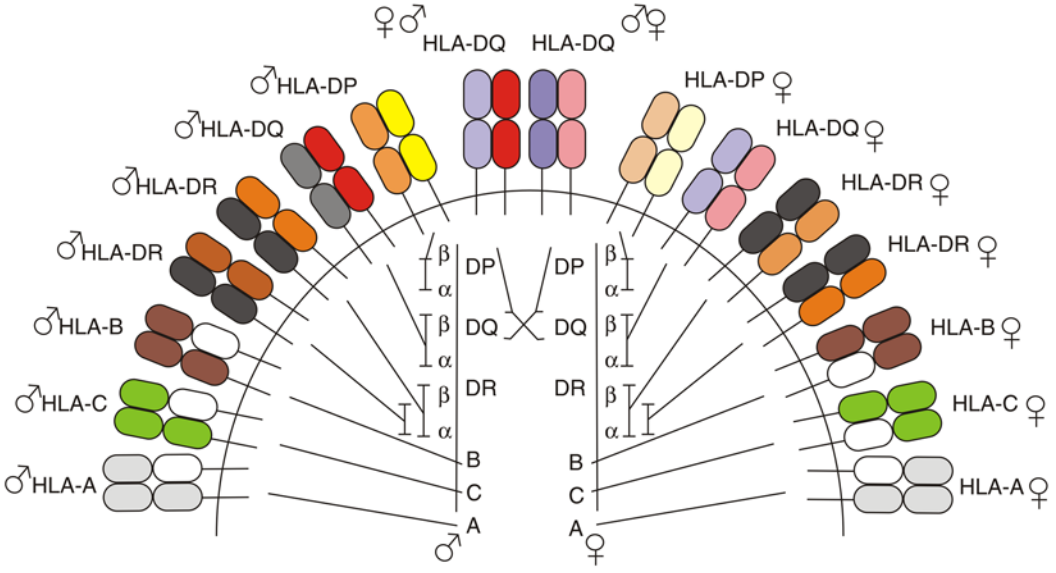


FIGURA 4.
Expresión de moléculas MHC clase I y clase II y su patrón de herencia.
En la gráfica se muestra el número de moléculas heredades del padre y de la madre y la expresión celular en un individuo normal cuya herencia es mendeliana codominante, aclarando la posibilidad de generar entrecruzamientos.

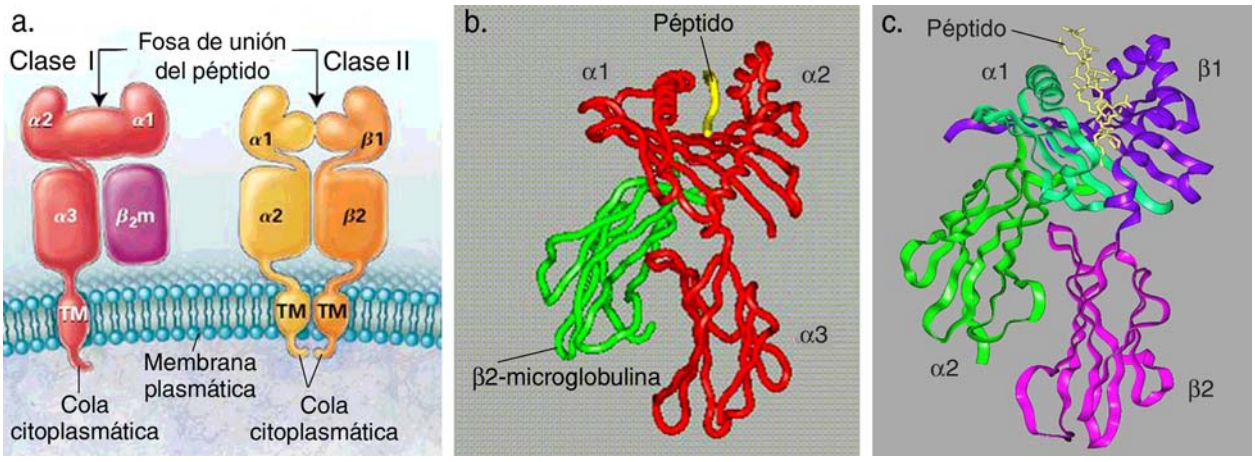


FIGURA 5.
Estructura de las moléculas MHC.
a. Gráfica de las cadenas y dominios que conforman las moléculas clase I y clase II. b. Estructura cristalográfica de las moléculas clase I, con los pliegues α y β, y la fosa de unión a péptidos. c. Estructura cristalográfica de las moléculas clase II, con los pliegues α y β, y la fosa de unión a péptidos

de la conformación total del heterodímero. La interacción entre la cadena a y la α2-microglobulina es un componente indispensable para que la molécula de clase I pueda unir un péptido a su fosa de anclaje.

Las moléculas HLA clase II están compuestas de dos cadenas polipeptídicas, asociadas de manera no covalente, denominadas cadena α o pesada, de 34 KD y una cadena β o liviana con un peso aproximado de 29 KD. Ambas cadenas son codificadas en el MHC y cada una de ellas posee dos dominios, denominados α1 y α2, β1 y β2. Los extremos N-terminal de las cadenas α y β, con sus dominios α1 y β1 interactúan para formar la fosa de anclaje a péptidos, la cual es estructuralmente similar a la de las moléculas clase I, con la diferencia de que la fosa de clase II es abierta en su porción central, lo que le permite unir péptidos de mayor tamaño y pueden anclarse tanto al interior del péptido como en los extremos. Los residuos polimórficos de las moléculas clase II están localizados en los dominios α1 y β1, sobre todo en la cadena β. Por su parte, los dominios α2 y β2 de estas moléculas tienen el equivalente estructural y funcional de los dominios α3 y β2-microglobulina de las moléculas clase I. Estos dominios son conservados y en particular el dominio β2 es el encargado de interactuar con la molécula CD4 del linfocito T. El extremo C-terminal de la cadena α y la β, continúan en un segmento de aproximadamente 25 aminoácidos que atraviesa la membrana celular y una pequeña cola intracitoplasmática (Figura 5).

Al igual que las moléculas de clase I, las MHC clase II son heterodímeros conformados por la cadena α, la cadena β y el péptido, que son expresados en forma estable en la superficie sólo cuando están unidos.

Función

Dentro del MHC hay múltiples genes que codifican para diferentes proteínas, cada uno de ellos con una función definida, pero muchos de los cuales participan en el sistema inmunológico, bien sea en inmunidad innata, como es el caso de la región clase III y los genes para el sistema del complemento, o en inmunidad adquirida, en el caso de las regiones clase I y clase II.

Las moléculas HLA clase I tienen como función primordial, presentar péptidos de origen intracelular a los linfocitos T CD8+ a través de su receptor (TCR), para que se inicie la respuesta inmune celular de tipo específico. Los péptidos presentados por estas moléculas deben pasar por un procesamiento antigénico como se tratará más adelante.

Las moléculas clase II, también presentan péptidos, pero de origen extracelular a los linfocitos T CD4+, y son reconocidos a través del TCR de éstos. La Tabla 1 resume las características funcionales de las moléculas clase I y II.

TABLA 1. Características funcionales de las moléculas MHC clase I y clase II.

Característica	MHC Clase I	MHC Clase II
Cadena polipeptídica	Cadena α (44-47 kD) β2-microglobulina (12 kD)	Cadena α (32-34 kD) Cadena β (29-32 kD)
Localización de residuos polimórficos	Residuos α1 y α2	Residuos α1 y β2
Sitio de unión al TCR	Dominios α3 se une al CD8	Dominio β2 se une al CD4
Tamaño del péptido que se une	8 a 10 aminoácidos	10 a 30 aminoácidos
Nomenclatura en el humano	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

Características de los péptidos presentados en el contexto MHC

Dado que al definir las propiedades de las proteínas inmunogénicas, una condición esencial es que sus péptidos puedan ser procesados y presentados en el contexto del MHC, es claro que al conocer las características de estos péptidos puede usarse la información para el diseño de vacunas, partiendo de la inserción de secuencias peptídicas definidas a las moléculas MHC, para ser usadas en procesos de inmunización.

Las moléculas MHC presentan especificidad frente al tipo de péptidos que presentan. Cada molécula de clase I o clase II posee una única fosa de enlace a péptidos y presenta sólo un péptido a la vez, no obstante, cada molécula posee la capacidad de unir múltiples péptidos, esta característica se conoce como promiscuidad inmunológica, dado que cada individuo sólo tiene entre 12 y 16 moléculas de HLA en su superficie celular y éstas son suficientes para cubrir todo el repertorio de péptidos al que se ve enfrentado durante su vida.

Los péptidos que se unen a las moléculas MHC deben tener varias características que dependen no sólo del péptido sino también de la fosa de anclaje en las moléculas MHC. Los péptidos que se unen a las moléculas de clase I son péptidos de 8 y 10 aminoácidos, mientras que los de las moléculas de clase II poseen entre 10 y 30 residuos. Igualmente, de la conformación de aminoácidos del péptido dependerá la unión a la molécula y el reconocimiento por parte del TCR.

La asociación del péptido con las moléculas MHC es saturable y de baja afinidad, menor que la observada entre antígeno y anticuerpo. Además, el proceso de asociación puede tardar entre horas y días para que se estabilice, lo cual es favorable para que el proceso de presentación antigénica se dé en el tiempo adecuado.

Los péptidos que se generan durante el procesamiento antigénico, se unen en forma extendida sobre la fosa de anclaje, presente en la molécula MHC, a través de residuos de aminoácidos complementarios, que encajan unos con otros. Los residuos presentes en las moléculas MHC son denominados "bolsillos", los cuales se encuentran distribuidos en toda la fosa de unión a los péptidos, y son los encargados de recibir los "residuos de anclaje", presentes en el péptido. Los residuos de anclaje pueden estar en el medio del péptido o en sus extremos. Se calcula que cada péptido puede tener entre uno y seis residuos de anclaje, lo cual se presume que es la respuesta a la variabilidad de péptidos reconocidos por las moléculas MHC y el TCR. En las moléculas de clase I, la unión del péptido se da por la parte central, mientras que en las moléculas de clase II las uniones son más flexibles y se hacen en los extremos (Figura 6).

Estructura genética del MHC

El MHC en los humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda 6p21.3. Este sistema de genes es el más grande del genoma humano y está dividido en 5 subregiones, que son los genes de clase I, clase II,

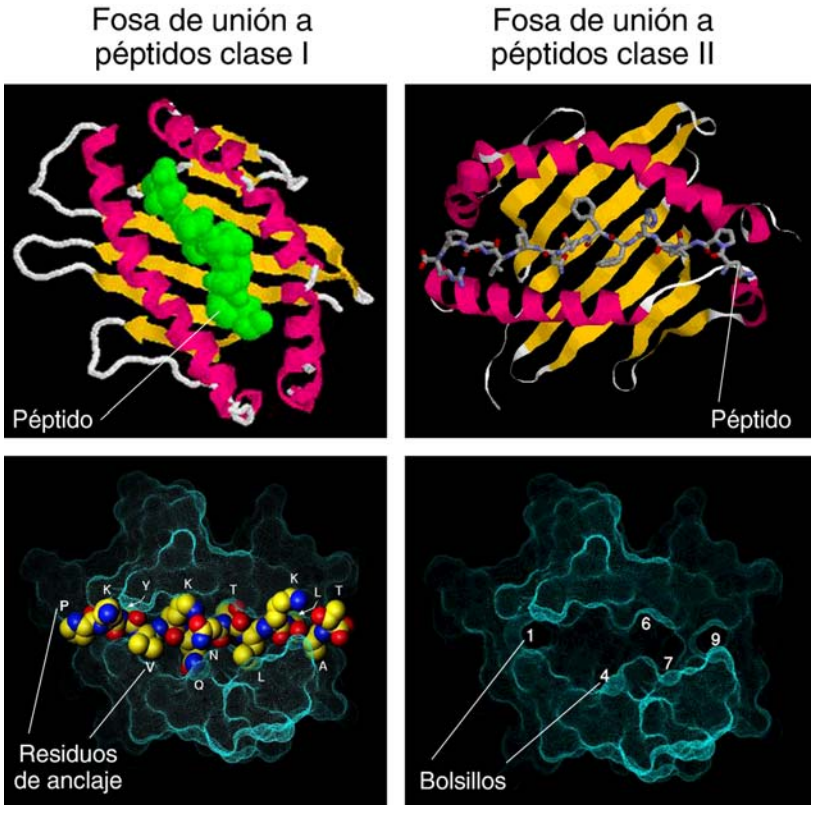


Figura 6.
Estructuras cristalográficas de la interacción péptido-MHC.
a. Molécula MHC clase I con su péptido de 8-11 residuos, cuya estructura encaja completa en la fosa de anclaje. b. Molécula MHC clase II con su péptido de mayor tamaño, cuya estructura se pliega para encajar en la fosa de anclaje. c. Residuos de anclaje presentes en el péptido. d. Bolsillos presentes en la molécula MHC, los cuales albergan los residuos de anclaje. (Adaptada de refs. 5 y 6)

Tabla 2. Número de genes en la región HLA clase I y clase II.

Genes	Expresados	Candidatos	No codificados	Pseudogenes	Total
HLA clase I	6	0	0	13	19
HLA clase II	11	2	0	6	19
MIC	2	2	0	5	9
Total MHC	19	2	0	24	45
No MHC	111	15	4	64	194
Total para todos los genes	130	17	4	88	239
Region clase I	41	12	3	66	122
Región clase III	58	2	0	2	62
Región clase II	16	3	0	15	34

clase III, subregión clase I extendida y clase II extendida, todos considerados de respuesta inmune (RI) y de supresión inmunológica (SI). Los loci involucrados en este sistema son alrededor de 421, distribuidos en cerca de 7,6 Mb del cromosoma 6, con una distancia genética de 8 centimorgans, lo que significa que la frecuencia de entrecruzamiento es del 4% después de cada meiosis.

La región clase I está ubicada en la parte más telomérica del cromosoma, compuesta por los loci para los genes HLA-A, HLA-B, HLA-C que codifican para la cadena α de las moléculas HLA de clase I, denominadas clásicas. Además, en esta región se encuentran otros loci, denominados HLA-E, L, J, K, H y G, que codifican para las moléculas HLA no clásicas. Aparte de las moléculas HLA, dentro de esta región se han encontrado otros genes, importantes y que corresponden a los MICA y MICB (ligando para los receptores de células NK), los genes Hfe (codifican para las histonas), el locus para receptores olfatorios y el gen que codifica para proteínas denominadas dedos de zinc, entre otros. También se observan en esta región cerca de 16 pseudogenes.

En la región clase II, están localizados los loci para los genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas HLA clase II DR, DQ y DP, así mismo se encuentran muchos de los genes que codifican para moléculas chaperonas, asociadas con el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos. Se calcula la existencia de 15 pseudogenes en esta región.

Por su parte, la región clase III, aunque menos polimórfica, es también poligénica; en ella se han identificado más de 50 genes, entre los cuales cabe resaltar los genes que codifican para los factores C3, C4 y C5 del complemento, para las proteínas de choque térmico HSP y para proteínas de la familia del TNF, incluyendo el TNF-α, entre otros. Datos más detallados de la constitución génica del MHC, pueden verse en la Tabla 2 y la Figura 7 y 8.

Regulación de la expresión génica

Durante los últimos años múltiples grupos han estudiado los promotores de los genes inmersos en el MHC y se han identificado varias regiones críticas, para la regulación de la transcripción de éstos. Dos potenciadores (enhancers) transcripcionales son identificados en la región promotora de los genes de clase I, llamados A y B, localizados en las posiciones -193 y -158 para el potenciador A y entre -120 y -61 para el B. Estas regiones están seguidas, hacia el extremo 3', por elementos inducibles por el IFN-γ. Igualmente, se han identificado dos sitios de unión al NF-kB, situados corriente arriba del potenciador B, así como también se encuentran cajas CCAAT y TATA, aproximadamente a 20 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción. Los potenciadotes A y B son muy conservados para todas los genes clase I clásicos, pero difieren mucho en los no clásicos, lo que podría explicar los patrones inusuales de expresión de estos últimos. Se ha observado que la unión de proteínas inductoras de trascripción al potenciador A, es inducida por el TNF-α y los lipopolisacáridos, no obstante la mayor regulación de la expresión de estas moléculas de clase I está dada por los IFN-α, β y γ y por elementos de respuesta a AMPc.

Por su parte, los genes MCH clase II poseen una región promotora, que se extiende 160 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, con elementos suficientes para regular la expresión tejido específica de estas moléculas. La región más proximal del promotor contiene elementos conservados de DNA, llamados X, Y, Z. Estos elementos tienen como función regular la transcripción de las moléculas y responder a la inducción por parte del IFN-γ, así mismo son sitios claves de unión de proteínas al DNA, en células que expresan constitutivamente las moléculas de clase II. El elemento X interactúa activamente con diferentes factores de transcripción, en mayor grado los de la familia RFX, además de tener elementos respondedores a AMPc. Recientemente se ha descrito un cuarto elemento de regulación, denominado elemento J, aunque su función no es muy clara, parece intervenir activamente en los procesos de trascripción.

El elemento más importante en la regulación de los genes de clase II es el CIITA, el más potente activador de la expresión de las moléculas de clase II, aunque no parece actuar directamente sobre el DNA, su función es tan importante que alteraciones en este factor se asocian con variantes del síndrome de linfocito desnudo, ya que no se observa expresión de moléculas de clase II en estas líneas celulares. La proteína CIITA es la encargada de la diferenciación tejido específica de las moléculas de clase II, por interacción proteína-proteína con otros factores de regulación de la expresión como es el caso del IFN-γ. Esta

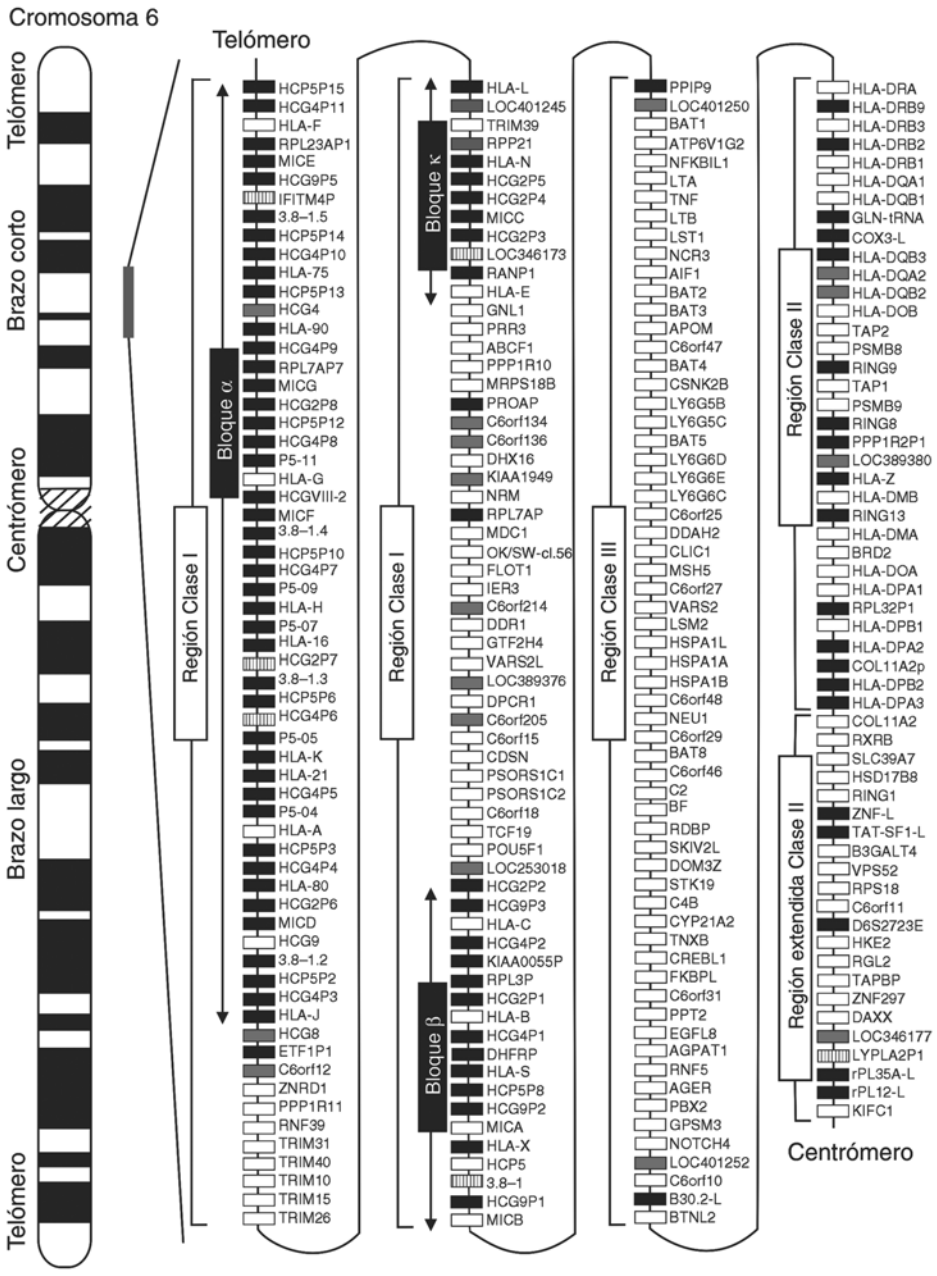


FIGURA 7.
Mapa genético del brazo corto del cromosoma 6.
En la figura se pueden observar todos los genes identificados hasta la fecha, tanto HLA como no-HLA, que conforman la región clase I, clase II y clase III del MHC. (Adaptado de ref. 9)

proteína es regulada genéticamente por tres promotores, cada uno de ellos específico para la expresión de moléculas clase II, en LB (PIII) y macrófagos (PIV).

Además de los antes mencionados, las moléculas de clase II poseen factores epigenéticos para el control de su expresión, más que todo en tejido trofoblástico y en células tumorales. En ambos casos parece alterarse la metilación, a nivel de las citocinas del promotor PIV del gen que codifica para la proteína CIITA, generando una pérdida de su función, lo cual altera la transcripción de las moléculas MHC clase II en estos tejidos.

Biosíntesis y moléculas chaperonas

Las moléculas MHC clase I y clase II están conformadas por múltiples subunidades, que requieren un estricto control antes de agruparse y salir a la superficie celular. Las moléculas MHC clase I son sintetizadas a nivel del retículo endoplásmico (RE) y son expresadas a nivel de la superficie celular de todas las células nucleadas en el humano, incluyendo los estadios primarios de la línea eritroide. Por otra parte, las moléculas MHC de clase II son sintetizadas también en el RE, pero sólo se expresan en forma constitutiva en células profesionales presentadoras de antígenos (Linfocitos B, Macrófagos y células dendríticas [CPA]), aunque pueden ser expresadas en forma inducida por otros tipos de células (CPA no profesionales).

Tanto para la síntesis y expresión de las moléculas de clase I como para las de clase II se requiere de varias moléculas chaperonas, muchas de ellas residentes en el RE. Las chaperonas son proteínas cuya función es mediar el plegamiento y el ensamblaje de las moléculas MHC como estructuras oligoméricas. Las chaperonas previenen la inactivación y agregación de moléculas inmaduras que no hayan sido apropiadamente plegadas.

Chaperonas implicadas en la biosíntesis y ensamblaje de las moléculas de clase I

Calnexina

Es una chaperona residente en el retículo endoplásmico, que se asocia a través de la β2-microglobulina con la molécula MHC recién sintetizada; la función primordial de esta chaperona es facilitar el adecuado plegamiento de la molécula de clase I, favoreciendo la formación de puentes disulfuro. Su participación en el ensamblaje no es esencial, pero sí es de gran importancia en la retención de moléculas libres de péptidos o péptidos recirculantes.

Calreticulina

Es una chaperona igualmente unida al RE, con alta homología con la calnexina. Estas moléculas se unen en estadios más tardíos de la síntesis de la molécula MHC clase I, y su función principal es la de permanecer ligada a la β2-microglobulina hasta que la molécula de clase I encuentre un péptido que se le una. Otra función de esta chaperona es la de estabilizar la formación del complejo clase I-calnexina-TAP.

Tapasina

La tapasina es una glicoproteína trasmembranal, codificada en el MHC y perteneciente a la superfamilia de las Ig, esta molécula está encargada de estabilizar la unión de las MHC clase I y las TAP. Su función es esencial para la retención del complejo MHC clase I-péptido hasta que esté completamente estable para salir hacia la membrana celular. La acción de esta glicoproteína es alelo dependiente, ya que en el caso de alelos de baja expresión ésta parece estar sobreexpresada, lo que hace que la molécula sea retenida en el RE; la estabilidad de la molécula de clase I dependerá de la acción de la tapasina. De igual manera la tapasina ha sido involucrada en la edición de péptidos para ser presentados en el contexto de clase I.

ERp57

Es una enzima que actúa en conjunto con la calreticulina y la tapasina, capaz de editar péptidos y cuya función primordial es la de facilitar la formación de los enlaces disulfuro de las moléculas de clase I.

TAP

Las moléculas TAP son glicoproteínas, codificadas por los genes TAP1 y TAP2, que se expresan a nivel de la membrana del retículo endoplásmico, y son requeridas para el transporte y ensamblaje de los péptidos presentados por las moléculas MHC clase I. Se les conoce como proteínas asociadas al transporte de péptidos y los genes que las codifican (TAP1 y TAP2) se hallan ubicados entre los loci HLA-DM y HLA-DQ de la región clase II del MHC. El transporte de péptidos por parte de TAP es dependiente de los alelos de clase I, y la eficiencia en transportar es mayor para los alelos de tipo A y C que para los alelos tipo B. Estos genes son polimórficos su polimorfismo influye sobre el tipo de péptido que será transportado. El bloqueo en la expresión o función de las moléculas TAP se ha visto asociado con disminución en la presentación antigénica y parece ser una de las causas del síndrome de linfocito desnudo.

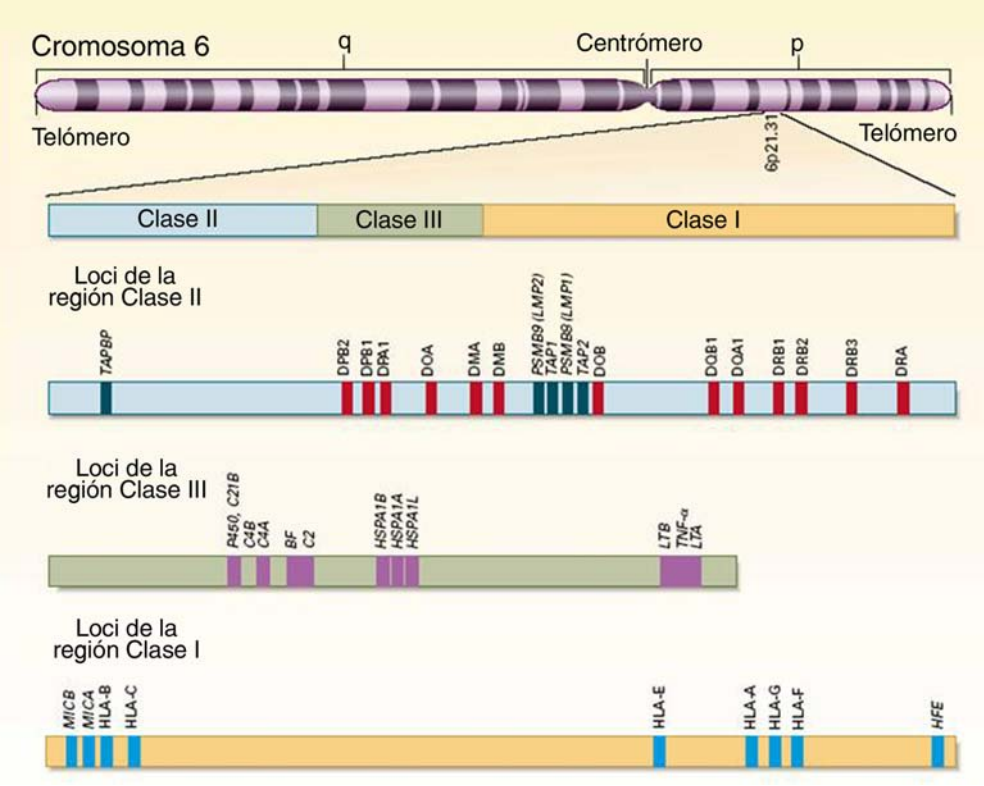


FIGURA 8.
Esquema genético de la distribución de los genes de las regiones clase I, clase II y clase III del MHC, que hacen parte del procesamiento y presentación antigénica; ubicados en la posición 6p21.31. (Adaptada de refs. 5 y 6)

Chaperonas implicadas en la biosíntesis y ensamblaje de las moléculas clase II

Cadena invariante (Ii)

Es una proteína con cuatro isoformas, todas ellas generadas por procesos de rearreglos alternativos. Su función es la de unirse a la molécula MHC de clase II para retenerla en el RE hasta que esté madura y estable. La Ii tiene la capacidad de unirse a la fosa de unión a péptidos hasta que llegue el péptido específico para esa molécula y facilita la señal de procesamiento por vía endocítica para las moléculas de clase II durante la presentación cruzada.

CLIP

Corresponde a un residuo de 81-105 aminoácidos generado de la Ii, durante su proceso de maduración. Su función es de estabilizar la conformación de la molécula de clase II y ayudarla en su tránsito por los endosomas. Este péptido tiene la capacidad de autoliberarse de la fosa de unión a péptidos para dar paso al péptido antigénico.

HLA-DM

Es una molécula chaperona de conformación idéntica a la de las moléculas de clase II clásicas, pero sin la capacidad de presentar péptidos. La regulación de esta molécula es la misma que para las demás clase II y su expresión es dependiente de IFN-γ. La función de esta molécula es la de facilitar la liberación del CLIP y promover la unión del péptido a la molécula de clase II.

HLA-DO

Posee las mismas características que el HLA-DM, y su expresión está limitada a células B y epitelio tímico, esta molécula se caracteriza por unirse fuertemente a la DM, modulando su actividad. Esta modulación está basada en la capacidad de modificar el pH del medio en el cual actúa DM, inhibiendo su función en los endosomas tempranos y favoreciéndola en los endosomas tardíos donde debe unirse el péptido. También la molécula HLA-DO se comporta como editor de péptidos y puede afectar la maduración de las moléculas MHC clase II.

Procesamiento y presentación antigénica

Vía endógena

Los péptidos que se unen a las moléculas de clase I son generados a partir de proteínas sintetizadas en el citosol, proteínas maduras que han cumplido su ciclo celular o proteínas recientemente sintetizadas que presentan algún tipo de alteración y que deben ser rápidamente degradadas, pues generalmente son productos defectuosos de los ribosomas, llamados DRiPs. Estos péptidos también pueden provenir de algún patógeno intracelular que ha sido degradado en el citosol. Estas proteínas son degradadas durante el paso a través del proteosoma, luego de que la proteína que les da origen fue ubicuitinada. En el proteosoma las proteínas son fragmentadas por medio de subunidades con actividad catalítica, entre las cuales están las moléculas LMP2 y LMP7, ambas codificadas en el MHC, además del MECL-1. El proteosoma es una organela cuya actividad proteolítica depende de inducción por IFN-γ, una vez se activan los receptores, para esta citoquina, entonces recibe el nombre de inmunoproteosoma, el cual es el principal generador de péptidos para ser presentados en el contexto de clase I. Luego del paso del péptido a través del proteosoma, éste sufre un nuevo proceso de fragmentación dependiente de endopeptidasas y aminopeptidasas, a partir de las cuales se generan los oligopéptidos de tamaños entre 8 y 15 aminoácidos, óptimos para ser presentados por las moléculas de clase I. Estos oligopéptidos son trasportados hasta el lumen del RE por las moléculas TAP. Se tiene evidencia de que algunos oligopéptidos pueden pasar desde el proteosoma hasta el lumen del RE por simple difusión, de forma independiente de TAP.

Una vez el péptido llega hasta el lumen del RE, allí lo esperan las moléculas MHC clase I recién sintetizadas y estabilizadas con ayuda de las moléculas chaperonas mencionadas antes. En el RE la calnexina y la calreticulina facilitan la unión de la β2-microglobulina a la cadena α, luego la enzima ERp57 facilita la unión de este complejo con las moléculas TAP, para favorecer el contacto con el oligopéptido y así se forma finalmente el complejo MHC clase I-péptido. Este complejo sale del RE a través del aparato de golgi, para salir al final por exocitosis a la superficie celular y ser reconocido por el TCR específico en el linfocito T CD8+ (Figura 9).

Vía exógena

Los péptidos presentados por esta vía provienen de proteínas endocitadas del exterior de la célula por fagocitosis o pinocitosis. Las proteínas son capturadas en endosomas especializados, presentes en las CPA. Los endosomas son vesículas ácidas con alto contenido de enzimas proteolíticas; luego de que las proteínas son degradadas en forma enzimática y por el cambio de pH, el endosoma pasa a unirse con el lisosoma convirtiéndose en un fagolisosomas, en los cuales se generan los oligopéptidos finales con tamaños entre 10 y 30 aminoácidos, apropiados para ser unidos por las moléculas de clase II. Una vez el péptido se genera, las moléculas clase II recién sintetizadas en el RE, se unen a Ii, y son transportadas hasta el fagolisosoma tardío denominado MIIC, donde entran en contacto con el péptido, después de que las moléculas HLA-DM y DO han fragmentado y retirado la Ii y el CLIP, dando paso a la unión del péptido en la fosa de anclaje de la molécula de clase II. Por último se forma el complejo MHC clase II-péptido que se estabiliza y es conducido por exocitosis hasta la superficie celular de la CPA para ser presentadas a través del TCR al linfocito T CD4+ (Figura 10).

Presentación cruzada

El principio general de la presentación antigénica está basado en las vías endógena y exógena revisadas antes;

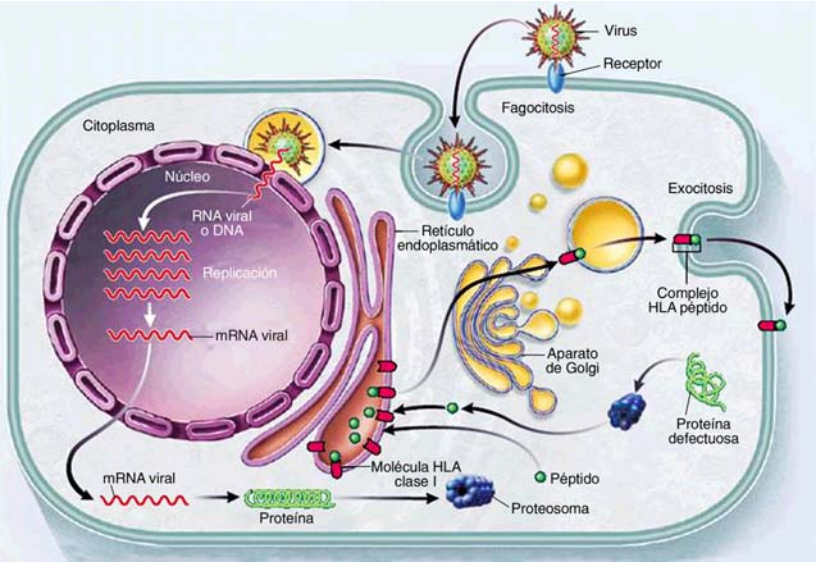


FIGURA 9.
Procesamiento antigénico vía endocítica.
El esquema muestra los pasos para el procesamiento de péptidos endógenos, los cuales son degradados por el proteosoma, transportados por TAP hasta el retículo endoplásmico donde interactúan con la molécula MHC clase I recién sintetizada, y con ayuda de las moléculas chaperonas ensamblan el complejo péptido-MHC, que pasa a través del aparato de golgi, para dirigirse luego a la superficie de la célula presentadora de antígenos. (Adaptada de ref. 5)

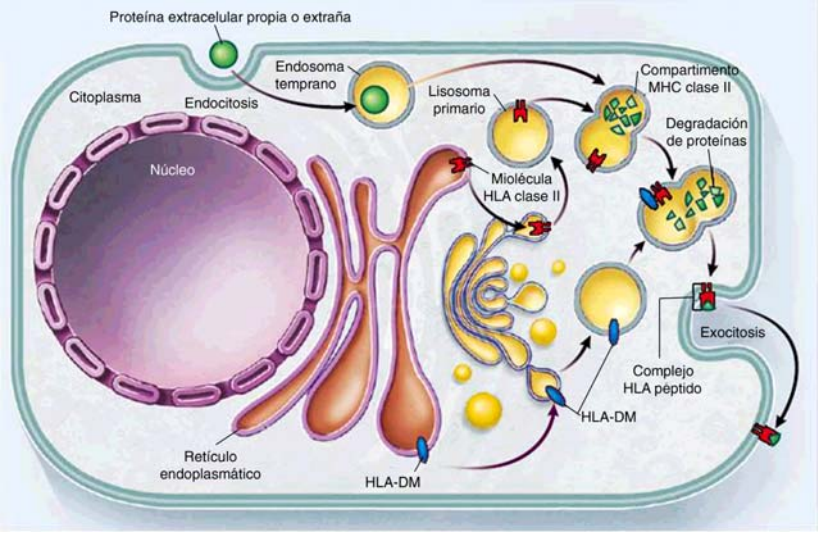


FIGURA 10.
Procesamiento antigénico vía exógena.
El esquema muestra los pasos para el procesamiento de péptidos de origen externo, los cuales son degradados en el sistema de vesículas lisozomales, para pasar luego al endolisozoma, donde entran en contacto con la molécula MHC clase II sintetizada en el retículo endoplásmico. Con la ayuda de las moléculas chaperonas tales como Ii, HLA-DM y HLA-DO. Ensamblan el complejo péptido-MHC, que pasa a través del aparato de golgi, para dirigirse luego a la superficie de la célula presentadora de antígenos. (Adaptada de ref. 5)

no obstante, existen vías alternas de presentación, las cuales involucran la presentación de péptidos de origen interno a través de las moléculas MHC de clase II y, a su vez, péptidos de origen interno pueden ser presentados en el contexto de clase I. A estas vías de presentación alternativas se les denomina presentación cruzada.

La presentación cruzada se ha observado sobre todo en células dendríticas. Estas células exhiben la capacidad de presentar péptidos de origen externo, que son fagocitados en vesículas y degradados en el lisosoma; estos péptidos son unidos a moléculas de clase I que han sido recicladas, luego de que se ha culminado la vía endocítica convencional y son almacenadas en los endosomas, los cuales se unen a los lisosomas y facilitan el contacto de péptidos de origen externo con las moléculas de clase I. Esta hipótesis es poco probable y los esfuerzos por comprobarla experimentalmente son poco efectivos. No obstante, la presentación cruzada que se ha podido comprobar para las moléculas de clase I, corresponde a la macropinocitosis de proteínas externas, que una vez ingresan al lisosoma, son semidegradadas y luego liberadas al citosol, donde sufren un segundo proceso de fragmen-

tación en el proteosoma y entonces entran a la vía de procesamiento y presentación antigénica endógena, convencional.

Los procesos de presentación cruzada por la vía de MHC clase I se asocian a la presentación de antígenos de origen viral y bacteriano que logran evadir la presentación endógena convencional, pero que son eliminados por vías alternas generadas por la célula. Este tipo de presentación se da más que todo en células dendríticas, y se ha observado que activan fuertemente (hasta 100.000 más fuerte) al linfocito T citotóxico. Entre muchos otros el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus Sendai sólo logran ser presentados por esta vía. En forma similar, algunas células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos solubles por esta vía y se observa que son altamente inmunogénicos.

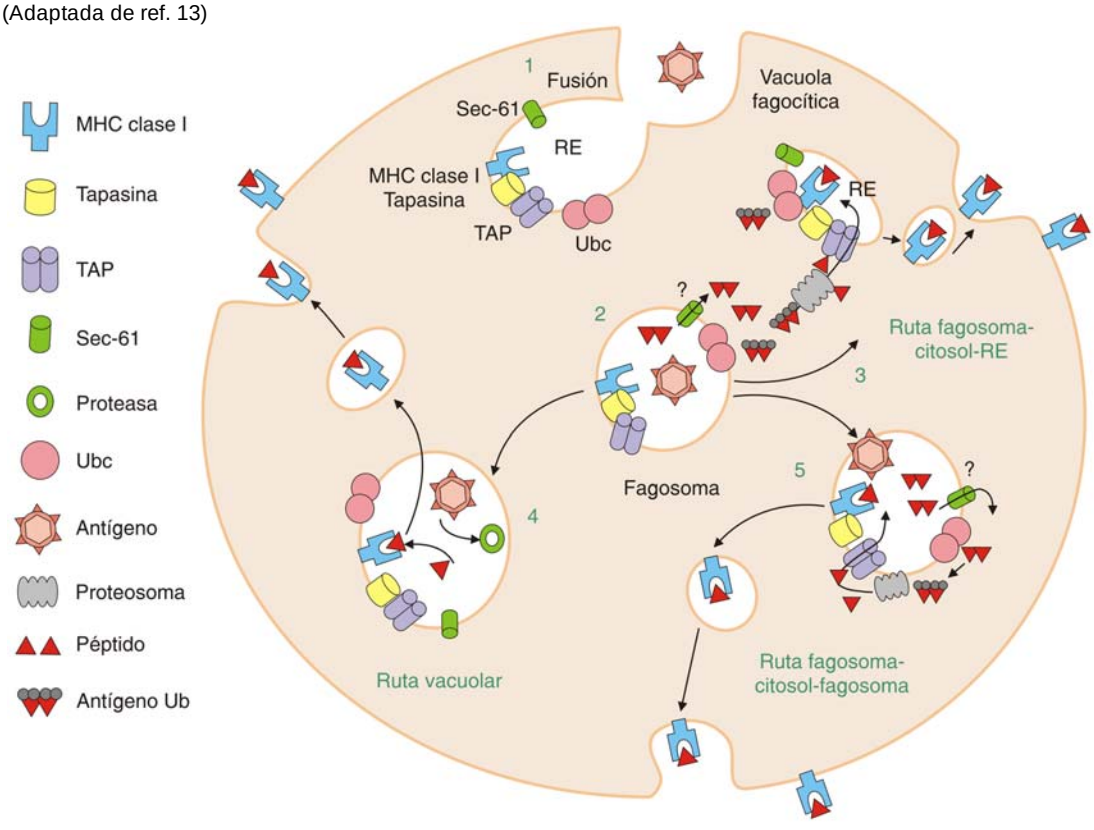
Otra vía para presentación cruzada está basada en la capacidad fagocítica que tiene el RE, de formar vacuolas digestivas a partir de su membrana, dentro de las cuales las proteínas sufren acidificación y lisis, generando péptidos que pueden entrar en contacto directo con las moléculas de clase I, residentes en el RE y ser exportados como complejo estable MHC clase I-péptido, hasta la superficie celular. Sin embargo, esta vía, al igual que otras propuestas (Figura 11), continúa en comprobación.

Con respecto a la presentación cruzada de antígenos internos por vía exógena, es poco lo que se conoce; no obstante, se comienzan a proponer vías de presentación alternas, que involucran las moléculas de clase II, aunque hasta el momento no hay evidencia que lo sustente.

Molécula CD1 y presentación de antígenos no proteicos

Las moléculas CD1 se identificaron por primera vez usando anticuerpos monoclonales que se unían a los timocitos humanos. Estas moléculas tienen una estructura génica (intrones/exones) similar a la del MHC Clase I, y codifican para proteínas de membrana con dominios α1, α2 y α3; sin embargo, la homología entre aminoácidos de estos dominios con los de las moléculas MHC clase I es sólo del 21%. Los genes para el CD1 se agrupan en una familia, ubicada en la posición 1q23.1 en el humano y tienen su ortólogo en el cromosoma 3 del ratón. Esta familia está compuesta por cinco genes identificados como CD1A, CD1B, CD1C, CD1D y CD1E, que codifican para cinco proteínas CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD1e. Hasta el momento se conoce que el polimorfismo de estos genes es muy limitado y básicamente sólo se han reportado dos alelos para el gen CD1A y CD1E denominados CD1A*01 y CD1A*02, CD1E*01, CD1E*02 respectivamente. Los alelos CD1A presentan secuencias diferentes que se expresan a nivel de la cavidad de enlace de antígenos; sin embargo, no difieren en el reconocimiento por parte de anticuerpos específicos. Por su parte, los alelos CD1E parecen influenciar bastamente en la unión a diferentes tipos de ligandos.

FIGURA 11.
Posibles vías para la presentación cruzada.
El esquema muestra los mecanismos propuestos para que se de la presentación cruzada de moléculas externas por la vía del MHC clase I. (Adaptada de ref. 13)



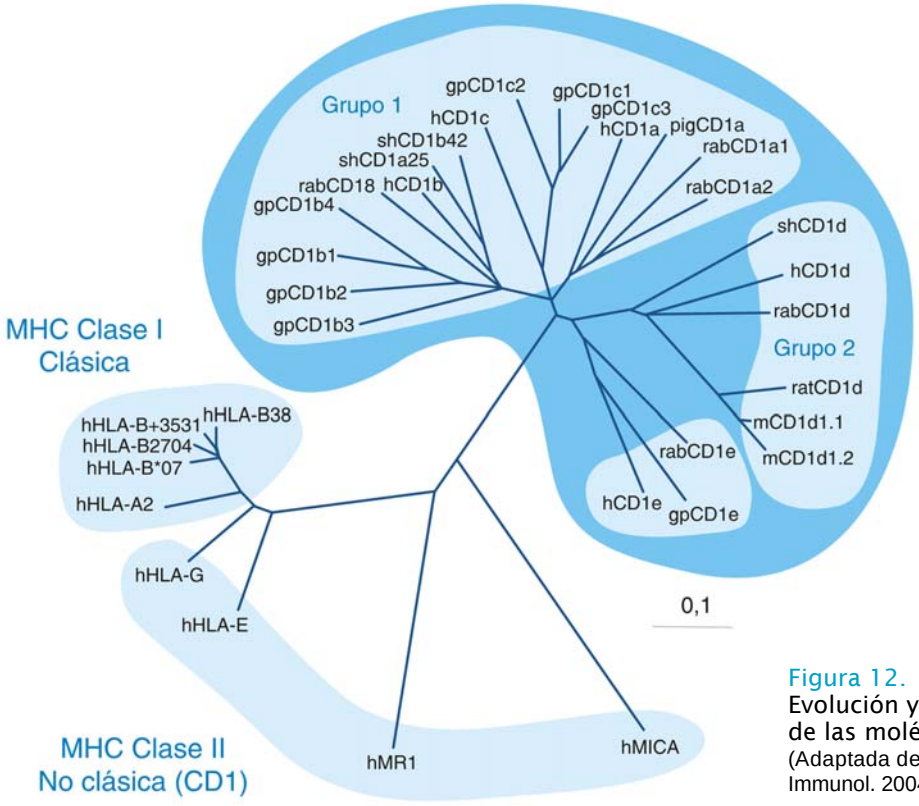


Figura 12.
Evolución y conformación genética de las moléculas CD1.
(Adaptada de Brig. M, et al. Ann R Immunol. 2004).

Los polipéptidos CD1 se expresan como heterodímeros, compuestos por una cadena α de 43 Kd, unida en forma no covalente a la β2-microglobulina; este complejo se expresa en la superficie celular. En general, la asociación con la β2 microglobulina parece ser necesaria para la expresión en la superficie, sin embargo, el isotipo CD1d, puede expresarse en forma eficiente sin unirse a esta molécula.

La función primordial de las moléculas CD1 es la presentación de antígenos lipídicos externos a los linfocitos T. Se ha podido identificar un amplio rango de lípidos presentados por estas moléculas, en particular, lípidos que conforman la pared celular de micobacterias y ácidos micólicos, ácidos grasos, lipoarabinomanan y glicolípidos en general. A pesar de que no hay una razón todavía definida para que las moléculas CD1 presenten sólo antígenos tipo lípidos o glicolípidos, se sabe que estos antígenos están restringidos a la presentación por CD1a, b y c.

Se han identificado grupos de células T restringidas a la presentación antigénica de tipo CD1 c y d. Estas células parecen estar siendo estimuladas por la presentación de antígenos lipídicos propios, como es el caso del fosfatidilinositol y fosfatidilglicerol, por tanto se podrían considerar LT autorreactivos, activados tanto en humanos como en murinos. Así mismo se ha observado la presentación de lípidos tumorales por parte de la molécula CD1d.

A pesar de que no existen cristalografías claras del complejo TCR-CD1-antígeno, es posible que el TCR establezca un contacto con el CD1, similar al observado con las moléculas del MHC. En cuanto al antígeno, es claro que el TCR establece contacto con los glicolípidos presentados, bien sea propios o extraños y se encarga de responder en forma muy específica, más aun en los LT restringidos a CD1. Estudios funcionales con la molécula CD1 y el TCR, muestran claramente que el LT es mejor estimulado al reconocer antígenos con cadenas de 26 carbonos, y a menor tamaño en la cadena es menor la activación y pueden llegar a activarse hasta con cadenas de 95 carbonos.

El ensamblaje de la cadena pesada de la molécula CD1 se lleva a cabo en el RE, allí se da también la asociación con la β2-microglobulina, por medio de moléculas chaperonas comunes a las moléculas MHC clase I, como son la calreticulina, la calnexina y la ERp57, además, todas las observaciones realizadas hasta el momento indican que en el RE tiene lugar en la unión del CD1, particularmente el d, con el antígeno.

Luego del ensamblaje y unión con el antígeno en el RE, las moléculas pasan rápidamente por el aparato de golgi y son dirigidas hacia la superficie celular en donde presentan el antígeno. Luego las moléculas CD1 son recicladas e internalizadas de nuevo por endosomas y lisosomas (Figura 13).

Las moléculas CD1 a, b y c se expresan primordialmente en CPA y son presentadas tanto a LT CD4+ como a los CD8+. Por el contrario, las moléculas CD1 d son expresadas sólo en células del sistema monocito/macrófago y son presentadas a células T restringidas a CD1, dentro de las cuales, las células NKT son las que presentan el mayor número de receptores para estas moléculas. La presentación antigénica por la vía de las moléculas CD1 es altamente importante en procesos infecciosos, tumorales y autoinmunes.

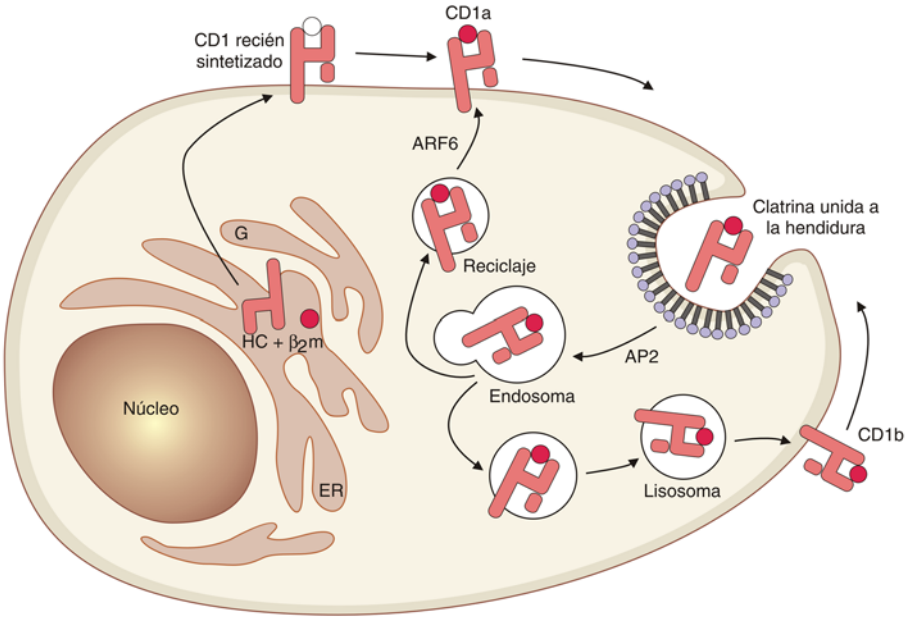


FIGURA 13.
Mecanismo de presentación antigénica por la vía de las moléculas CD1.
Esta vía es muy similar a la presentación por MHC clase I, al igual que la estructura de las moléculas, pero varia en función del tipo de antígeno que presenta, el cual corresponde a glicolípidos. (Adaptada de Brig. M, et al. Ann R Immunol. 2004).

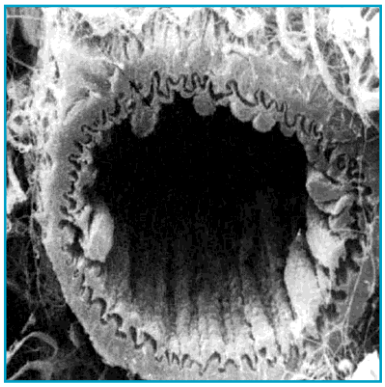
Referencias

1. Manfred Brig., Michael B. Brenner. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. Annu Rev Immunol 2004; 22:817–90
2. Danchin E, Vitiello V, Vienne A, et al. The major histocompatibility complex origin Immunological Reviews 2004; 198: 216–232
3. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Philadelphia PA: Saunders Co, 2002.
4. Urban RG, Chicz RM. MHC molecules, expression, Assembly and function. New York, NY. Chapman and Hall. 1996
5. Klein J, Sato A. The HLA system, first of two parts. N Eng J Med 2000; 343:702-709
6. Klein J, Sato A. The HLA system, Second of two parts. N Eng J Med 2000; 343:782-786
7. Geraghty DE, Daza R, Williams LM, et al. Genetics of the immune esponse:identifying immune variation within the MHC and throughout the genome Immunological Reviews 2002; 190: 69–85
8. Hennecke J, Wiley DC. Structure of a Complex of the Human T Cell Receptor (TCR) HA1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class II Molecule, HLA-DR4 (DRA 0101 and DRB1*0401): Insight into TCR Cross-Restriction and Alloreactivity. J Exp Med 2002;195: 571–581
9. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. Tissue Antigens 2004: 64: 631-649
10. Boss JM, Jensen PE. Trascripcional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. Curr Opin Immunol 2003; 15:105-111
11. Kaer LV. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and Presentation Tissue Antigens 2002 60: 1-9
12. Lehner PJ, Cresswell P Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation Curr Opin Immunology 2004, 16:82-89
13. Ramirez MC, Sigal LJ. The multiple routes of MHC-I cross-presentation TRENDS in Microbiology 2004; 12:204-207
14. Ackerman AL. Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous Antigen. Nature Immunol 2004;5:678-684
15. Horton R, Wilmina L, Rand U et al. Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet 2004; 5:889-899

13

ENDOTELIO, ÓRGANO BLANCO EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTEMICAS

Pierre Youinou
Christelle Le Dantec
Boutahar Bendaoud
Valèrie Devauchelle
Yves Renaudineau
Christophe Jamin



Falta evidencia que relacione a los anticuerpos (Ac) anticélulas endoteliales (AECA) como patogénicos. Los AECA se encuentran frecuentemente asociados con los Ac-antifosfolípidos (aPL), unidos a complejos de fosfatidilserina (PS) con la β2–glicoproteina I (β2GPI). El mecanismo que corresponde a la producción de estos aPL patogénicos en presencia de los AECA es hasta el momento desconocido. Además, la PS se encuentra normalmente retenida en la parte interna de la membrana plasmática. Sin embargo, estudios recientes han planteado un nuevo debate sobre la patogenicidad de los AECA. Existe un grupo responsable para que la PS alcance la superficie celular, la cual es característica del compromiso celular apoptótico. Defectos en la remoción por parte de los macrófagos de las células apoptóticas inducidas por los AECA, pueden llevar a la exposición de β2GPI en su superficie y retar la tolerancia de los linfocitos T, hasta llegar a la producción de aPL. Algunos de estos AECA son inducidos por componentes de la membrana celular, mientras que otros reconocen antígenos "plantados" y posiblemente complejos receptor-ligando. Su heterogeneidad funcional es bastante reconocida. Otro grupo promueve el factor procoagulante y otro tiene la capacidad de inducir apoptosis en células blanco. Claramente, la demostración más directa de la patogenicidad de los AECA es el modelo murino de vasculitis inducido por auto-Ac.

Contenido

Medición de anticuerpos anticélulas endoteliales (AECA)
Efectos patogénicos de AECA
Antígenos blancos en células endoteliales
Prevalencia de AECA

Introducción

Las células endoteliales (CE) hacen parte de los vasos sanguíneos y contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria. Desde que se demostró que son blanco del ataque inmunológico (1-5), no es para sorprenderse que el daño vascular ocurra por los llamados anticuerpos (Ac) anti-células endoteliales (AECA). Esta autoreactividad fue originalmente descrita mediante análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (6,7) tomando secciones de tejido como sustrato (Figura 1) en suero de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES). La confiabilidad de la tinción con IFI luego fue mejorada (8), usando IgG purificada y fragmentos $F(ac')_2$. El impulso fue dado por una serie de estudios realizados para evaluar los AECA en una variedad de contextos clínicos, que compartían una característica común: lesiones vasculares generalizadas, entre los que se incluyen LES, Artritis Reumatoide (AR), Esclerosis Sistémica (SSc), Granulomatosis de Wegener (GW) y Síndrome de Kawasaki (KS). Los AECA son a menudo asociados con reactividad fosfolípidica y están presentes en el síndrome antifosfolipídico primario (PAP LS). No solamente son un gran número de enfermedades autoinmunes sistémicas positivas para los AECA, sino también varios estados infecciosos pueden promover su producción (9). Los AECA asumen el isotipo IgG, IgM e IgA, pero los resultados reportados varían de una enfermedad a otra, mientras aquellos recolectados en una misma enfermedad cambian de un estudio a otro (10). Tales discrepancias sugieren defectos metodológicos que deben ser primero evaluados, puesto que la exploración de los AECA es obstaculizada por la ausencia de métodos estandarizados para su detección. El suero positivo para los AECA muestra una amplia reactividad contra diferentes fuentes anatómicas humanas, adicionalmente algunos de estos están restringidos al linaje microvascular humano, y no al macrovascular.

En breve, dada la impresionante variedad de condiciones involucradas, es posible predecir que los AECA representan una diversa familia de auto-Ac. Los AECA naturales existen teniendo en cuenta que son producidos en cocultivos de linfocitos B infectados con el virus Epstein-Barr (EBV) con CE. Mas aún, el endotelio parece ser diverso en términos de su fenotipo (11-15), de su biología (16) y de sus implicaciones fisiopatológicas (17, 18). Este proceso se basa también en el hallazgo que el suero aparentemente negativo frente a un tipo dado de CE puede llegar a ser positivo, si son utilizados los sustratos celulares apropiados (19). Las CE están involucradas en un gran número de trastornos (10, 18), lo cual sustenta la atractiva hipótesis que los AECA de fuentes alternativas reconocen diferentes tipos de moléculas blanco en las CE (20). La positividad en los AECA no implica causalidad, ya que, su presencia procede a la lesión más que precederla, además hay nueva y sustancial evidencia de su rol patogénico. Numerosos efectos deletéreos han emergido recientemente (2, 4, 17, 21).

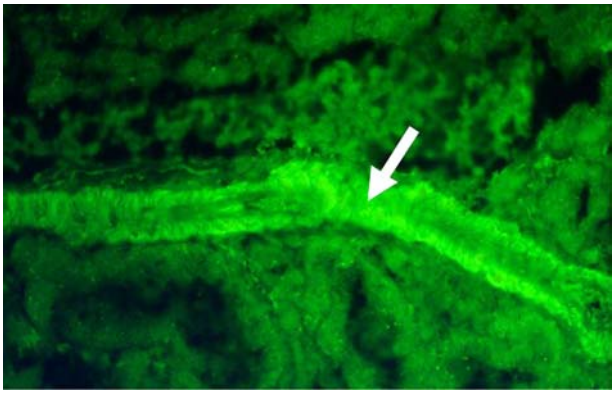


FIGURA 1.
La IgG sérica de un paciente con lupus eritematoso sistémico se une a células endoteliales vasculares.

El corolario de tal diversidad se basa en que los antígenos blanco (Ag) difieren de un grupo de AECA a otro (10, 21, 22). De hecho, hasta el momento hemos sido incapaces de identificar la mayoría de ellos, y el estado antigénico del endotelio en diferentes sitios está lejos de completarse. Adicionalmente, se ha señalado que las citoquinas pueden convertir las CE en inmunogénicas, mientras que células relacionadas inactivas no sufren cambio alguno. Varios de los AECA pueden lesionar las CE de capilares y otros unirse a las CE macrovasculares (19-22). Un análisis profundo proporcionaria nuevos conocimientos para el entendimiento de su patogénesis, y representaría una nueva herramienta para el óptimo y temprano tratamiento de condiciones autoinmunes inflamatorias.

Precauciones para la cuantificación de anticuerpos anti-células endoteliales

Las discrepancias exigen estar atento de las dificultades técnicas y de los posibles errores. Los AECA son clasificados en aquellos que requieren fijación de las células y en aquellos que usan suspensiones de CE vivas. El primer grupo incluye técnicas tales como, IFI en secciones de tejido, citotoxicidad de CE marcadas con Cr^{51} o I^{111}, radio-inmunoensayo y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Existen algunos problemas con el método estándar desarrollado por Hashemi, Smith e Izaguirre (23), con respecto al uso de Ac heterófilos contra proteínas de suero fetal bovino las cuales se enmascaran como AECA (24). El ruido de fondo resultante puede ser erradicado al bloquear por absorción con dilución amortiguadora con suero fetal bovino. Sin embargo, para prevenir su pérdida a través del ensayo, las células deben fijarse y permeabilizarse con glutaraldehido. Consecuentemente, los auto-Ac contra componentes citosólicos no específicos de las CE llegan a ser detectables, como ha sido reportado en malaria o LES, pero no en lepra (25). Dado que los anticuerpos anti-nucleares y el factor reumatoide se sobreponen con los AECA, éstos también han sido eliminados en un ELISA usando CE lisadas como agente de captura (26). La dificultad permanece al querer librarse de todos los componentes ajenos de la membrana en esta preparación. Un resultado AECA falso-negativo puede

deberse a la falta de expresión de Ag específicos en las CE; el análisis de los AECA requiere la disponibilidad de numerosos tipos de CE, incluyendo células microvasculares (20).

Las CE preferiblemente son usadas como células en suspensión. Los análisis por citometría de flujo (FACS), inmunoprecipitación (IP) seguidos por Western Blot (WB) y densitometría han sido utilizados. Las CE obtenidas de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen como las de más amplio uso (Figura 2a). Las células extraídas son reconocidas por la expresión del factor de von Willebrand (Figura 2b). Líneas celulares híbridas, por ejemplo la línea EA.hy926, la cual combina CE y células de líneas celulares epiteliales A-549 (27), son cultivadas y almacenadas sin perder su habilidad de retener los AECA. En la práctica, puede ser necesario absorber el suero con células epiteliales antes de ser evaluados. Varias líneas celulares, tales como la línea HUVEC inmortalizada con SV40 (simian-virus 40) (28), son a veces empleadas. El método de ELISA es cuantitativo desde que las CE son usadas sólo una vez alcanzan la confluencia máxima. Por lo tanto, es posible evaluar un gran número de sueros de pacientes al mismo tiempo. Es necesario mencionar el hecho que las HUVEC tienen un limitado uso rutinario, debido a que su número es limitado (aproximadamente 10^6 células son extraídas de un cordón) y el procedimiento llega a tornarse sumamente tedioso. Aún peor, el fenotipo de estas células es inestable, y las CE cultivadas mueren del tercer al cuarto subcultivo. En contraste, las líneas celulares tienen la invaluable ventaja de un número ilimitado de células además, su fenotipo permanece igual hasta por 50 subcultivos o más. Aunque el término AECA ha sido acuñado para designar a estos auto-Ac, esto no significa que se unan única y exclusivamente a las CE.

Con respecto al desarrollo de la unión de los AECA en el laboratorio, un método preciso es la ELISA celular, comparado con FACS, IP y WB (29). La comparación de numerosas técnicas de ELISA (30) revela diferencias en los títulos de AECA en un mismo suero. La IFI, una prueba semicuantitativa que no permite el adecuado seguimiento de los niveles de AECA, no es recomendada. Las pruebas de citotoxicidad y radio-inmunoensayo no se encuentran más en uso.

La FACS, donde células vivas son suspendidas en una solución amortiguadora (Figura 3), fue calificada como el

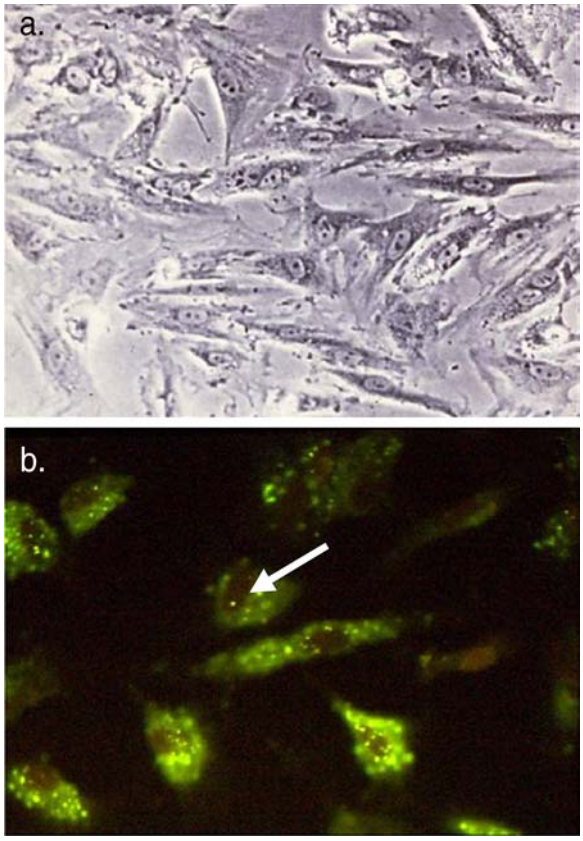


Figura 2.
Cultivo de células endoteliales (a) reconocidas como tales por la presencia del factor von Willebrand (b).

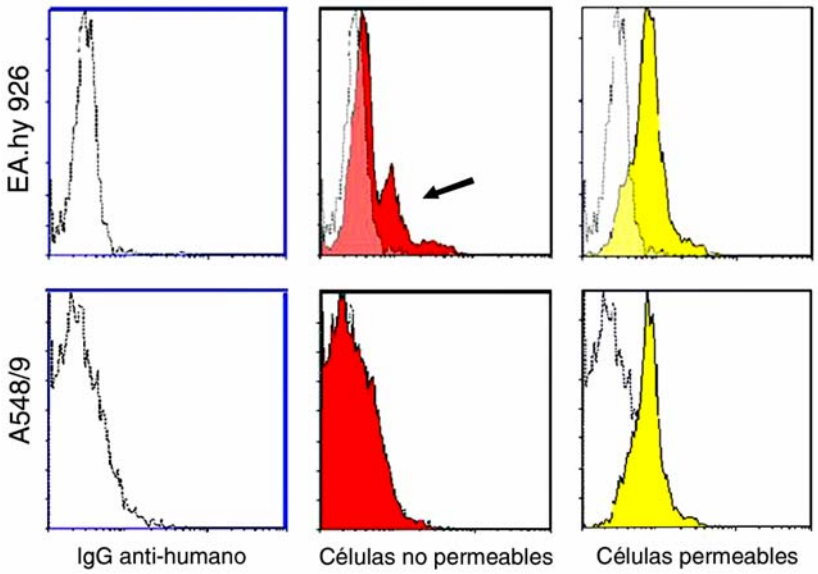


Figura 3.
Anticuerpos anticélulas endoteliales (AECA).
Son determinados usando células híbridas EA.hy926 como sustrato y citometría de flujo. El anticuerpo reconoce las células híbridas, pero no sus equivalentes epiteliales A548/9. Ellos se unen a la membrana de células no permeabilizadas y penetran aquellas permeabilizadas.

ensayo más confiable para medir auto-Ac específicos de membrana de CE (31), en base a que la ELISA de CE fijadas no detecta específicamente los AECA. Se ha notado que tal reactividad predomina en lepra sobre lo encontrado usando ELISA. Sin embargo, este no es el caso de malaria (25). La creación de suspensiones de auto-Ac puede subestimar la expresión de ciertos epítopes. De otra forma, un programa informatico para la estandarización del análisis por FACS no ha sido desarrollado. La consecuencia, es la limitación de la evaluación del fenotipo de las CE y por lo tanto de la expresión de antígenos blanco (32). Los datos obtenidos por FACS, IP y WB (29,31) tienen que ser discretamente comparados con aquellos obtenidos por ELISA. Debido a la incertidumbre de los resultados, nosotros evaluamos el mismo suero para identificar los AECA, utilizando ELISA celular propio, FACS y WB (Figura 4), y concluimos que (Tabla 1), idealmente los tres métodos deben ser aplicados (29).

Las CE muestran diferentes distribuciones de los Ag en su superficie, dependiendo de si están en contacto con un soporte sólido o flotando en el medio. Los auto-Ac contra la matriz pueden confundirse con los AECA (33), no obstante esta situación no elimina el significando patológico en la lesión vascular. La IP y el WB son difíciles de manejar para ser aplicados en forma rutinaria. Un problema adicional con estos métodos son las proteínas citoplasmáticas las cuales pueden ser precipitadas, junto con las glicoproteínas de superficie.

Adicionalmente, basado en las variaciones de pozo a pozo y de plato a plato en el número de CE, es esencial establecer criterios en la forma de reportar los resultados, ya que no deben ser expresados en densidades ópticas, sino en índices de unión, usando la fórmula: 100 x (S-A) (B-A), donde S es el resultado de la prueba, A el control negativo y B el control positivo (34).

Efectos patogénicos de estos auto-anticuerpos

La patogenicidad de los AECA permanece incierta. Sin embargo, pistas de sus efectos deletéreos fueron sugeridas por los niveles de IgG, al fluctuar con la actividad de la enfermedad en pacientes con LES, GW y KS (1-5). Los análisis de los AECA también pueden delimitar subgrupos de pacientes con SSc (35,36) vasculitis (37) o miopatías inflamatorias (38) con diferentes pronósticos, aunque es notoriamente difícil predecir algún resultado en tales enfermedades. Con respecto a SSc (Figura 5), los AECA estuvieron presentes en 3 de 13 pacientes con fenómeno de Raynaud (RP), 16 de 36 pacientes con SSc limitada y 26 de 31 pacientes con SSc difusa (35). En vasculitis, la unión de Ac a CE fue mayor en el suero de pacientes con lesión de vasos sanguíneos de pequeño calibre que en aquellos con inflamación de grandes y medianos vasos (37). Se observó una correlación positiva entre los AECA y el RP, el compromiso pulmonar y las miopatías inflamatorias (38). Además de estas observaciones clínicas, los AECA están asociados con hipertensión arterial pulmonar en SSc (39),

Figura 4.
Perfil densitométrico del Western Blot de un suero positivo para anticuerpos anticélulas endoteliales.

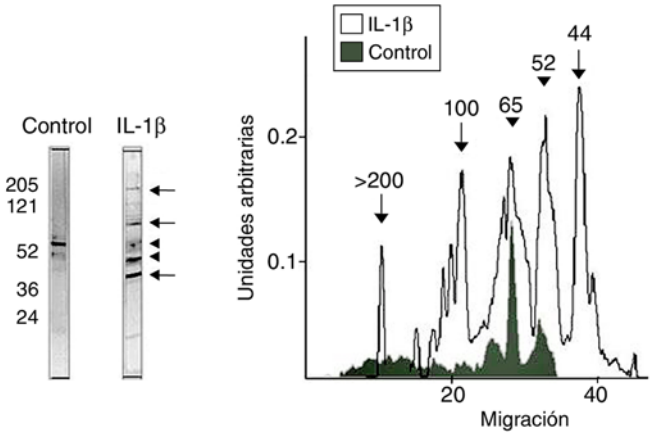


Tabla 1. Paralelo entre los métodos de detección de Anticuerpos Anti-célula Endotelial (AECA).

		Número (%)			
ELISA	FACS	NC	LES	GW	SSp
+	+	1 (0.4)	12 (19.1)	2 (3.9)	0 (0.0)
+	-	5 (3.0)	15 (23.7)	4 (7.8)	3 (15.0)
-	+	0 (0.0)	12 (19.1)	1 (1.9)	0 (0.0)
-	-	159 (96.6)	24 (38.1)	44 (86.4)	0 (0.0)
	TOTAL	165	63	51	20

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) no detecta los mismos AECA que el análisis FACS en controles normales (NC), pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Granulomatosis de Wegener (GW) o Síndrome de Sjögren primario (SSp).
Adaptado de ref 29.

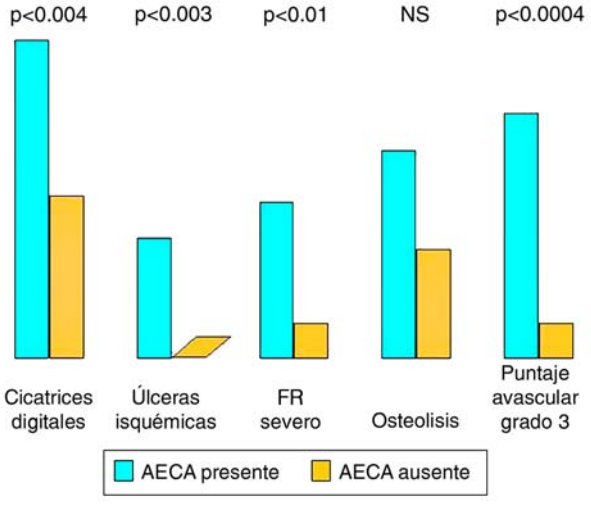


Figura 5.
Relación entre anticuerpos anticélulas endoteliales (AECA) y la severidad de la enfermedad en 50 pacientes con escleroderma.
FR: Fenómeno de Raynaud. (adaptado de Salojin et al. ref 35).

falla renal en LES (40), vasculitis en AR (41) y fibrosis pulmonar en dermatomiositis (38, 42).

Algunos de estos AECA causan la eliminación de CE mediada por complemento en LES (8), KS (43) y síndrome hemolítico urémico (HUS) (44), o inducen citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC) en GW (45) y SSc (46-48). La trombomodulina (TM), una glicoproteína específica de las CE es liberada por las células lesionadas en GW y otras vasculitis sistémicas (49). Evidencia adicional de la patogenicidad de los AECA es el hecho (50) que durante el embarazo se presenta una respuesta inmune activa con aumento en la actividad de los AECA (51), un 24% de mujeres con pérdidas fetales fueron positivas para los AECA (52). Otra prueba genuina de la patogenicidad de estos fue dada por la enfermedad inducida mediante la manipulación de modelos murinos (53), donde la producción de los AECA murinos y el desarrollo de vasculitis fueron generados por la inmunización con los AECA humanos.

Bajo la estimulación por parte de los AECA, el endotelio sufre cambios que le permiten participar en la respuesta inflamatoria (Tabla 2), lo que se denomina activación de CE (54). Algunos investigadores reportaron que 57 sueros AECA-negativos producen los mismos efectos que 23 sueros AECA-positivos de pacientes con LES (55). Esto es probablemente debido, a la presencia de AECA dirigidos contra epítopes de CE detectables en células adherentes de un ELISA, pero indetectables en células suspendidas del análisis FACS usado en estos estudios. La mayoría de los expertos en el campo sostienen que los AECA activan sus células blanco (56-59). Las teorías sobre el mecanismo de las condiciones vasculares asociadas con los AECA han sido enfocadas en la elevada expresión de moléculas de adhesión, tales como la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1). Este incremento, junto con la liberación de TM (49,57) y del heparan sulfato (HS) (60), así como la liberación de citoquinas quimiotácticas, interferón-γ (IFN-γ), interleuquina-1 beta (IL-1β), IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica del monocito -1, podrían contribuir al proceso inflamatorio. Este fenotipo proagregante y proinflamatorio puede ser la clave del reclutamiento de leucocitos que infiltran la pared vascular. Es interesante que la transferencia de CE de un medio condicionado luego del pretratamiento con los AECA e inmunodepleción de IgG desenmascara factores solubles que imitan los efectos de los AECA (58), i.e. daño mediado por neutrófilos a CE (61) y citotoxicidad (62). Otro mecanismo patogénico de los AECA (63) incluye el papel de las enzimas proteasas en SSc.

Un grupo diferente de AECA ha demostrado inducir factor tisular en CE (64,65) y contrarrestar la excesiva formación de trombina. Este mediador funciona como un agente proinflamatorio de acción prolongada al promover la síntesis de proteínas requeridas para la activación de neutrófilos durante la inflamación. Como soporte de este argumento, marcadores de las vías hemostáticas y fibrinolíticas han mostrado estar activados en mujeres no embarazadas AECA-positivas con abortos recurrentes (52). Adicionalmente, los efectos protrombóticos de la activación de CE recaen en la pérdida de moléculas anticoagulantes de superficie, tal como la TM y HS, así como la apoptosis celular (66).

Tabla 2. Efectos de la activación de células endoteliales (CE) por Anticuerpos Anti-célula Endotelial (AECA).

- Expresión incrementada de E-selectina, molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM-1).
- Liberación de la trombomodulina y el heparán sulfato.
- Liberación de citoquinas quimiotácticas: principalmente interleuquina-6 y proteína quimiotáctica de monocitos 1.
- Reclutamiento de leucocitos.

De esta forma, un óptimo descubrimiento ocurrió cuando algunos AECA revelaron iniciar apoptosis. Las CE vasculares apoptóticas llegan a ser procoagulantes (67), este mecanismo puede también estar interviniendo en la aterosclerosis (68), en conjunto con anti-β2GPI, la antioxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y con aPL (69-71). Los AECA están efectivamente asociados con aPL (71): éstos se unen para activar CE (72), y a cambio, los Ac extraídos de CE se unen a PL (73).

La apoptosis de CE ha sido establecida como el evento desencadenante en el modelo de gallinas para SSc humano (74). En nuestro estudio (75), la incubación de CE con los AECA derivados de pacientes con vasculitis o con los AECA monoclonales resultó en la expresión de fosfatidilserina (PS) en la superficie de las células, que se estableció a través de la unión de la anexina V (AV). El examen morfológico, la enumeración de células hipoploides, el "blotting" de fragmentos relacionados con la apoptosis de la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP), el estudio de fragmentación del DNA y análisis por microscopia óptica, de fluorescencia, confocal y electrónica confirmó la apoptosis de las CE (Figura 6). Este mecanismo fue subsecuentemente confirmado al ser aplicable al modelo de gallinas de SSc tanto a nivel *in vitro* (76) como *in vivo* (77). Nosotros también mostramos que el corte de PARP (56) no es mediado por radicales libres de oxígeno. Tales mecanismos han sido, sin embargo (78), involucrados en casos de apoptosis inducida por los AECA. En este contexto, la apoptosis y la penetración celular por auto-Ac de linfocitos reactivos (79) y los AECA en CE pueden representar procesos relacionados (80 y datos no publicados), dado la gran cantidad de evidencia que ciertas IgG son capaces de penetrar a las células vivas, e incluso ingresar a la membrana nuclear (81). Complicaciones similares han sido descritas en lepra (25) y en la infección por el virus del dengue (82). A la luz de tales hallazgos hemos evaluado si la activación es un prerrequisito para la apoptosis de CE mediada por los AECA (57). Establecimos que la habilidad de algunos AECA de activar las células es irrele-

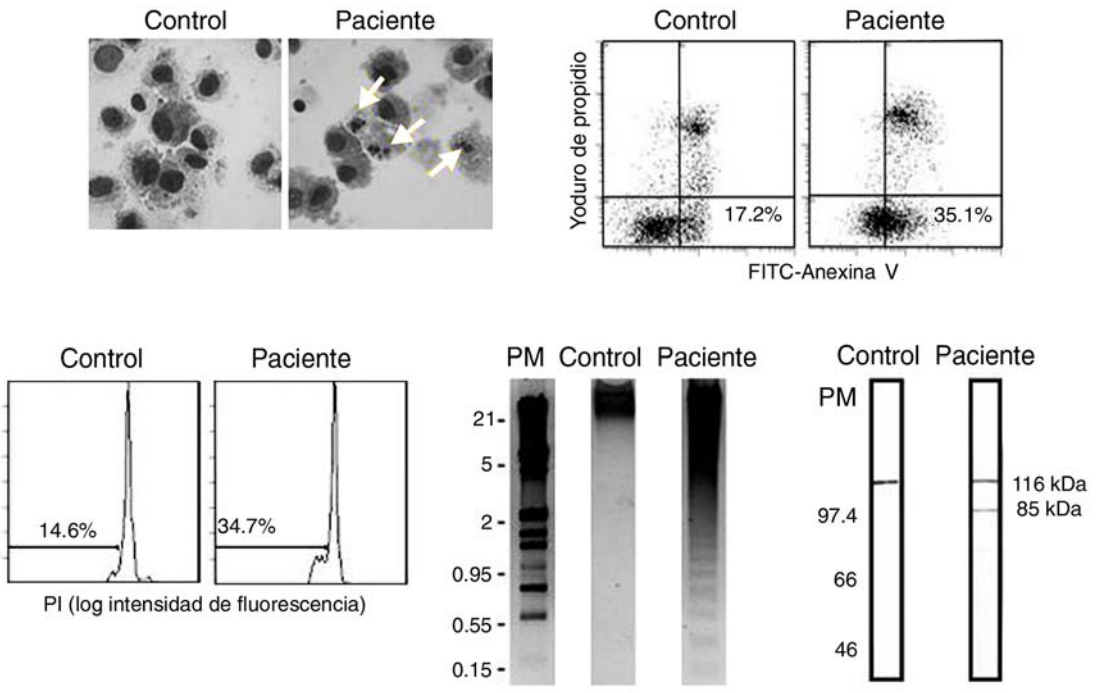


FIGURA 6.
Apoptosis inducida por anticuerpos anticélulas endoteliales.
En el sentido del reloj desde arriba a la izquierda: examen morfológico, unión de V anexina, clivaje de polimerasa poliADP-ribosa, fragmentación de DNA y enumeración de células hipoploides. PM: peso molecular.

vante para la naturaleza del desorden y demostramos que la activación no juega ningún papel en el advenimiento de la apoptosis. Estos hallazgos sugieren que los AECA representan una respuesta normal para desechar las CE no deseadas, a través de la fagocitosis de CE que se encuentran en apoptosis (83). Este mecanismo puede ser defectuoso en estados autoinmunes.

El suero de pacientes con KS, HUS o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) inducen apoptosis, en presencia de IL-1 o IFN-γ, pero los agentes responsables de iniciar la injuria de CE y el papel exacto desempeñado por los AECA son poco claros (43, 44, 84). La apoptosis de las CE en el tejido esplénico de pacientes con PTT (85) está marcadamente aumentada. También consistente con este proceso apoptótico está el desprendimiento de CE, su apariencia en la periferia (86), y la ausencia de cambios inflamatorios. La detección de estas CE en la circulación ha sido discutida, por la evidencia posterior de la vasculopatía difusa en LES (87) y el riesgo de trombosis (88), propuestas como un marcador para vasculitis asociadas al Ac-anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) (89), y usadas como una prueba biológica para el proceso de daño vascular que se presenta en SSc (90).

Hemos encontrado que la unión de los AECA a HU VEC hace la PL aniónica accesible a Ac anti-β2GPI (91). El cation se une a CE a través de un grupo de residuos de lisina (92), pero un nuevo mecanismo por el cual algunos aPL se unen a CE, ha sido propuesto. Después de la unión de los AECA, la PS debería volverse disponible y la β2GPI podría unirse a CE y por tanto permitir el reconocimiento del complejo β2GPI/PL por aPL. Se desconoce si los anti-β2GPI de pacientes con síndrome aPL primario reconocen nuevos epítopes formados luego de la unión de la molécula a estructuras aniónicas mostradas por β2GPI cuando está disponible en altas densidades (91-94). Como resultado, los aPL activan las CE (95). Esto es curioso si se compara con otros reportes (96), y podría ser el caso del Ac de baja afinidad, tales como los auto-Ac naturales (97), los cuales reconocen un estricto grupo de Ag y se unen pobremente a la membrana de la CE. De acuerdo con este concepto, reportes recientes indican que un Ac-monoclonal derivado de pacientes con LES reacciona con un epítope críptico en la β2GPI, siguiendo su unión a células apoptóticas (98), y que la β2GPI es requerida para que el aPL se una a CE (99). Hay, sin embargo, evidencia considerable que una proporción de aPL reconoce las CE y las plaquetas que activan CE (100) y se unen CE estimuladas por citoquinas (101) a través de β2GPI (102). Algunas inmunoglobulinas reactivas a CE, pero no todas (103), pueden ser absorbidas en PL (104), de aquí que, los aPL se cuentan parcialmente por AECA (105).

Así, no sólo los AECA fortalecen la unión de un aPL a las CE apoptóticas, sino que la translocación de PS de la capa interna a la externa de la membrana plasmática puede resultar en la producción *de novo* de aPL (91, 93, 99). Puede argumentarse que si los AECA fuesen primordiales para la producción de aPL, deberían estar presentes en todos los pacientes con aPL. Una proporción de suero contiene aPL pero no AECA, siendo una posibilidad que para el tiempo en que el paciente es monitoreado para AECA, éstos ya han desaparecido, así un suero aPL positivo ha llegado a ser AECA-negativo. De la forma como

fue demostrado por Shoenfeld (106), un aPL puede ser inducido por infección.

Antígenos blancos en las células endoteliales

I. Reactividad de la membrana celular

Aunque, los Ag blanco de los AECA son poco conocidos, podemos asumir seguramente que no están dirigidos hacia el HLA clase I ó hacia los polisacáridos del grupo sanguíneo ABO, ya que reaccionan de una manera similar con CE de diferentes HLA y ABO de donantes no relacionados (4). Tampoco reconocen las moléculas de clase II, las cuales pueden ser expresadas por las CE luego de la activación por IFN-γ. Los sistemas alotípicos de los AECA han sido descritos en reportes previos (107-109), pero estos han sido descartados. Se ha demostrado que estructuras crípticas de unión a los AECA (43) son reveladas luego de la activación con IL-1 o TNF-α en KS. Sin embargo, no sólo se ha establecido que los AECA son citotóxicos a las CE sin la influencia de las citoquinas (110,111), sino también se ha reportado que los AECA no están incrementados en esta panvasculitis (112,113). Curiosamente, el fenómeno inverso ha sido observado en HUS y PTT. La expresión de Ag de membrana estrechamente reconocidos por un subtipo de los AECA ha sido inhibida (43,44) al incubar las células blanco con IFN-γ previo al ensayo. Dado que tal fenómeno nunca ha sido confirmado, permanece la noción, aunque existe la probabilidad que el fenotipo de las CE sea modulado por citoquinas (114).

El suero positivo para los AECA reacciona con las CE humanas recuperadas de arterias grandes, principalmente la aorta, y también de grandes venas, como HUVEC. Otros AECA (presumiblemente un subtipo diferente de auto-Ac) reconoce las CE extraídas de la microvasculatura, particularmente en SSc (15,36). De acuerdo al tipo de CE utilizada para la detección, la prevalencia de los AECA se encuentra dentro de un 20 a un 40% de los casos de SSc. Dada la gran variabilidad en el patrón de Ag de las CE de un individuo a otro, existe una necesidad crítica que muchas líneas de CE (10) sean establecidas.

No obstante, estos hallazgos no implican que necesariamente los AECA sean específicos para las CE. Tal punto de vista se basa en la demostración de la reacción cruzada de los AECA con fibroblastos humanos (115, 116), apoyado por la inhibición parcial de reactividad por absorción del suero con los AECA por células mononucleares. También se ha encontrado que una estructura de 55 kiloDaltons (kDa) compartida por plaquetas y CE es reconocida por un subtipo de AECA (117), esta proteína de 70 kDa es caracterizada por un AECA monoclonal murino derivado de suero de ANCA en GW (118).

II. Caracterización de antígenos candidatos

En esencia, los Ag de las CE deben ser tan heterogéneos como sus auto-Ac relacionados. Estos deben ser pronos a variar según el donante de HUVEC, igual que las diferentes líneas celulares empleadas en las pruebas. En los últimos 10 años, los investigadores se han concentrado en este problema y han advertido que los blancos endoteliales para los AECA actúan como moléculas extremadamente dinámicas, las cuales son moduladas por una plétora de citoquinas tales como la IL-1, el TNF-α y el IFN-γ (114); además de un gran número de elementos físicos y otros procesos mecánicos no reconocidos. Estos pueden desenmascarar Ag crípticos endoteliales, como en el caso de PTT (115). Para ayudar y descifrar estas posibilidades, los Ag son clasificados en tres grupos: componentes de membrana, complejos receptor-ligando y Ag derivados de la corriente sanguínea y "plantados" sobre o dentro la membrana plasmática.

Componentes de la membrana

La IP de glicoproteínas de la membrana de CE con suero AECA-positivo de pacientes con AR complicada por vasculitis, produjo 12 proteínas que van desde 16 a 68 kDa aún no identificadas (120). A diferencia de estos hallazgos, el suero AECA-positivo de pacientes con LES mostró 19 proteínas blanco de 15 a 200 kDa (121) y 5 proteínas de 25 a 180 kDa (117) fueron precipitadas por AECA de pacientes con GW. La reactividad a una proteína de 120 kDa de la membrana de HUVEC ha sido identificada en pacientes con pérdidas fetales recurrentes (52), pero sin aPL. Aunque estos resultados son promisorios, algunas de las bandas de WB pueden ser artefactos, y solamente unas pocas proteínas estar posiblemente involucradas. Otras 28 bandas fueron observadas que unían AECA en PAPLS (122) (Tabla 3).

La TM es liberada después del daño de la CE y como tal es usada como un marcador de actividad en LES y vasculitis (49). Es interesante que, a diferencia del cáncer (123), la TM unida a la membrana nunca se ha identificado como un epítope convincente de las enfermedades autoinmunes. Los glucosaminoglicanos, en especial el HS, han demostrado hacer parte de esta reactividad, y subsecuentemente, los auto-Ac contra la heparina de pacientes con PAPL, han inhibido la formación de complejos antitrombina III-trombina (124). Por otro lado, la mayor reactividad al HS ha sido asociada con complicaciones renales en LES (125). La liberación de HS puede ser acelerada, y las CE adquirir rápidamente las propiedades de células activadas. En nuestro laboratorio (126), los AECA fueron detectados en 43 de 131 sueros autoinmunes y anti-HS en 25: un tipo de AECA se unió a las CE así como a HS en la fase sólida, pero no a la heparina soluble. Este grupo puede estar involucrado en la trombosis vascular del LES, debido a que la unión de la heparina a la antitrombina III es crítica para el mantenimiento de la anticoagulación en la sangre y a que anticuerpos monoclonales y policlonales anti-heparina de alta afinidad inhiben la formación de complejos trombina-antitrombina III. Un mecanismo similar está asociado con las exacerbaciones de falla renal en ratones MRL lpr/lpr (127).

TABLA 3. Componente de la membrana reconocidos por AECA.

Enfermedad	Peso molecular (kDa)	Antígenos de membrana identificados	Complicaciones asociadas
LES	38,41,66,150	Ribosomal	Nefritis
	55	Proteína – P	Trombocitopenia
	18		Pleuritis
Vasculitis sistémica	30-35		
	28	TPI	
AR	16-48		
	44		Vasculitis
GW	25,68,125,155,180	Proteinasa 3	
SHU y púrpura trombocitopénica	43		
Trombocitopenia inducida por heparina		Heparina Heparan sulfato	
SSc	18		

LES: Lupus Eritematoso Sistémico; TPI: Triosa Fosfato Isomerasa; AR: Artritis Reumatoide; GW: Granulomatosis de Wegener; SHU: Síndrome Hemolítico Urémico; SSc: Esclerosis Sistémica.

La proteinasa-3 (PR3), uno de los mayores blancos antigénicos para ANCA, ha sido mencionada por Mayet y colaboradores (128), migra a la membrana plasmática de las CE, luego de estimulación. Esto puede resultar de un proceso activo, induciendo la síntesis de proteínas y la actividad fosforilasa, en respuesta a citoquinas. De acuerdo con este grupo, tales auto-Ac incrementarían la adhesión de neutrófilos (129) y ejercerían efectos citotóxicos en las CE (130). Aunque corroboradas por Savags y colaboradores (131), estas observaciones permanecen controversiales, ya que otros investigadores, no han podido reproducir estos resultados (132, A Wiik comunicación personal y nuestras observaciones no publicadas). Ac contra la alfa-enolasa en la enfermedad de Behçet (133), contra la anexina V en arteritis de Takayasu (134) y LES (135,136), contra la vimentina en enfermedad coronaria luego de cirugía cardiaca (137,138), contra la activa en aterosclerosis carotídea (139) y contra ribosomas (140) han sido también mencionados.

Complejos receptor-ligando

Una inmunogenicidad artificial de complejos organizados en la superficie de CE y compuesta de cualquier ligando insertado en su receptor, puede participar en la fabricación de epítopes para los AECA. El complejo receptor-ligando se tornaría inmunogénico, a pesar de que alguno de sus componentes no lo fuese. Cualquier IgG unida al receptor Fc-γ (141) puede comportarse tal como la proteína PR3 ; un mecanismo alternativo ha sido propuesto por el hallazgo que ésta interactúa con una molécula de membrana de 111 kDa de HUVEC (142). Las LDL oxidadas (143) podrían también unirse a su receptor (144) e incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno y causar apoptosis de las CE (146).

Antígenos "plantados"

Aunque planteado, un tercer modelo no ha sido aún explorado en su totalidad. En el contexto de ciertas enfermedades autoinmunes activas, las proteínas derivadas de células vivas o en apoptosis, entran a las CE o se adhieren a su superficie. Ellas pueden constituir nuevos candidatos antigénicos para los AECA. Los Ac monoclonales derivados de un modelo de lupus murino se unen a HUVEC y a células mesangiales glomerulares, específicamente a DNA asociado a membranas, o indirectamente, en la forma de inmunocomplejos preformados DNA /anti-DNA (121). Mecanismos similares actúan en el LES humano (147), donde anticuerpos anti-DNA policlonales se unen a proteínas de membrana de 180, 110, 68, 44 y 35 kDa de las CE (148). La unión celular se correlaciona con la actividad de la enfermedad, sugiriendo que los AECA podrían ser patogénicos y de significancía pronóstica (149). La expresión de moléculas de adhesión, tal como el ICAM-1 y VCAM-1, pero no E-selectina, es regulada (150) por anti-DNA en LES. Otro Ag plantado podría ser la ribonucleoproteína U1 (151) y el factor 4 plaquetario/heparina (152). Las estructuras de la membrana, el complejo receptor-ligando o Ag plantados, quizás incrementan su expresión durante las recaídas y disminuyen durante las remisiones.

No obstante, los auto-Ag unidos por los AECA pueden estar encapsulados en cuerpos apoptóticos (153) y aún más, provocativamente, la localización intracelular, más que la exposición en la membrana (154) predispone para la producción de auto-Ac. Parece haber un avance promisorio con el establecimiento de nuestros 52 clones de CE por hibridación de HUVEC con líneas celulares de células epiteliales permanentes. Éstas parecen diferentes unas de otras en términos de fenotipo y producción de mediador (155). A través de estos clones, podría ser posible identificar un clon o una combinación de clones que expresen uno o muchos Ag específicos para los AECA, por ejemplo de LES y de otro grupo de clones con un Ag de GW; el CD36 (156,157) o la endotelina-1, la cual es liberada por células activadas por AECA (158) podría ser también un Ag específico para LES. Basados en este análisis, nosotros nos dirigimos a clarificar el interminable problema de los Ag. Esta aproximación ha sido hasta el

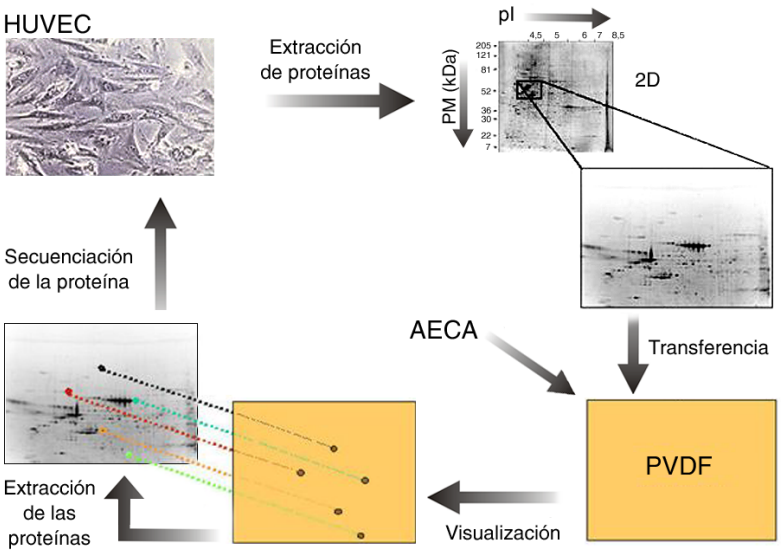


FIGURA 7.
Electroforesis bidimiensional del lisado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).
PVDF: difluorato de polivilinideno.

momento desilusionante, porque el fenotipo de algunos clones no es estable. Tales observaciones están de acuerdo con el reciente reporte (15) que aún cultivos primarios a corto plazo de CE humanas pueden no imitar adecuadamente el fenotipo de CE diferenciadas existentes en el microambiente *in vivo*.

Métodos alternativos han sido desarrollados, tales como las librerías sintéticas de scFo (160), electroforesis bidimensional (Figura 7) seguida de espectrometría de masa para identificar vimentina, calreticulina y proteínas de choque térmico (HSP60) como blancos para los AECA en lepra (25) y LES, respectivamente (Jamin y Youinou, manuscrito en preparación), y librerías de expresión (Figura 8) para detectar Ac anti-metiltransferasa, anti-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada y anti-proteína tirosin-fosfatasa δ en GW (Dugué y colaboradores, resultados no publicados). La HSP60 que reacciona con los AECA ha sido así probada como esencial en enfermedades autoinmunes tal como el LES (161), en estados infecciosos como la lepra (25) o citomegalovirus (CMV) (162) y en aterosclerosis (163).

Prevalencia de anticuerpos anti-célula endotelial (AECA)

Uno puede verse confundido por las inconsistencias en los resultados de las pruebas para los AECA; un consenso en su prevalencia está lejos de ser alcanzado (Tabla 4). Por ejemplo, han sido detectados en proporciones variables en pacientes con vasculitis, en 19-80% de los casos de GW (37, 164-168) y en 2-60% de micropoliarteritis. Los AECA no fueron asociados con enfermedad activa en el síndrome de Churg-Strauss (168). En contraste a los ANCA, los pacientes con GW que fueron persistentemente positivos para los AECA a pesar de tornarse ANCA negativos durante la remisión, (166,167) parecen tener riesgo para una subsiguiente recaída. La prevalencia de

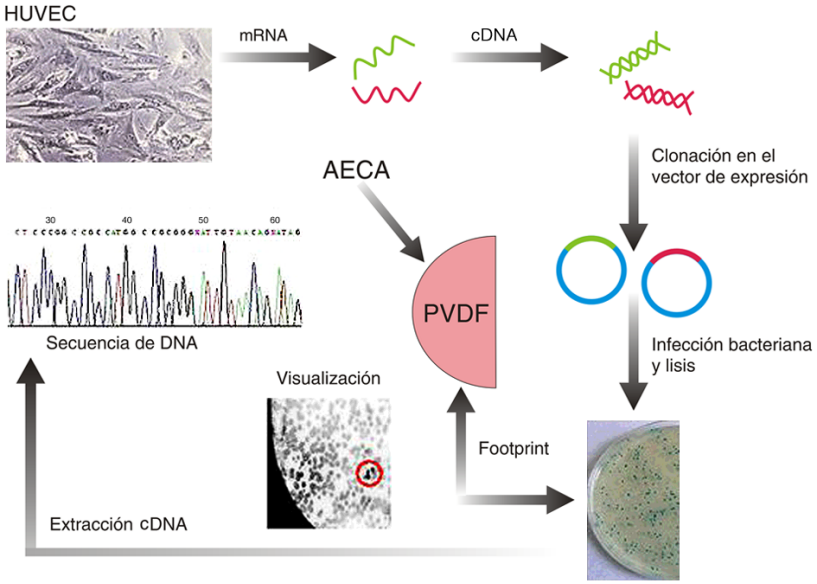


FIGURA 8.
Librería de expresión del DNA complementario de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).
PVDF: difluorato de polivilinideno.

los AECA va del 15 al 85% en LES (1,2,3,18,34,40,147) y de 0 a 87% en AR (1,2,3,10,29,120). La unión de los AECA al endotelio se incrementa por la IL-1, en los pacientes con LES. De igual forma cabe anotar que la unión de los AECA al endotelio está asociada con nefritis (40), con manifestaciones neuropsiquiátricas y con hipertensión pulmonar en LES (169); ademas, sus títulos declinan cuando los signos clínicos de vasculitis desaparecen en AR (29,120) y en LES (149).

En la enfermedad de Behçet (170,171) y en enfermedades virales, tales como la fiebre de las Montañas Rocosas (172), virus hepatitis C y crioglobulinemia mixta (9, 173), los AECA existen en el 18 al 80% de los casos, dependiendo del sustrato celular seleccionado para detectar la reactividad de las CE. Estudios ocasionales (174) han negado la presencia de los AECA en la enfermedad de Behçet. Sesenta y cinco por ciento (65%) de pacientes con KS (43, 55, 110, 111) producen estos auto-Ac. Los AECA han sido encontrados virtualmente en un 100% de los pacientes con el HUS (44). Lo mismo es cierto en PTT (124), aunque esto se ha debatido (175), así como en KS (176). De hecho, los AECA están siendo reportados en un exagerado número de contextos clínicos, incluyendo diabetes (177), falla del trasplante renal (178), enfermedad arterial coronaria en pacientes con trasplante cardíaco (179) y en la potencial predisposición para trombosis arterial coronaria (Vlachoyiannopoulos, Moutsopolous y Youinou, resultados no publicados).

Un gran número de condiciones anecdóticas han sido asociadas con AECA. Éstas incluyen el Síndrome de Sneddon (180) pero no la papulosis atrófica maligna (181), TA (37,182), vasculitis retinal (183), tromboangitis obliterante (184), enfermedad intestinal inflamatoria (185), preeclampsia severa (186), nefropatía por IgA (187), angioedema episódico con hipereosinofilia (188), nefropatía epidémica (189), hiperprolactinemia (190), hipertensión limítrofe (191), enfermedad mixta del tejido conectivo (192), hemodiálisis de pacientes urémicos (193), arteritis de la temporal comprobada por biopsia (194), úlceras crónicas en miembros inferiores (195), aterosclerosis prematura (196), sordera neurosensorial súbita (197) y en esclerosis múltiple (198).

Tabla 4. Prevalencia de AECA en enfermedades sistémicas.

Enfermedad	% de sueros positivos
Lupus Eritematoso sistémico	15 – 85
Artritis reumatoide	0 – 87
Esclerosis sistémica	15 – 84
Enfermedad mixta del tejido conectivo	45
Poliarteritis nodosa	56
Polimiositis	44
Poliarteritis microscópica	2 – 60
Granulomatosis de Wegener	19 – 80
Enfermedad de Behçet	18 – 80
Arteritis de Takayasu	95
Síndrome antifofolipídico	60 - 63
Síndrome de Kawasaki	65
Síndrome de Churo-Strauss	69
Púrpura trombocitopénica trombótica	13 - 100
Síndrome hemolítico urémico	93
Diabetes Mellitus tipo I	35

Conclusión

Finalmente, muchas aproximaciones metodológicas han establecido la inequívoca realidad de los AECA y su potencial patogenicidad (199). Parece haber diferentes familias de auto-Ac. Dada su patogenicidad potencial en enfermedades autoinmunes sistémicas (200), el futuro se ha planeado con subgrupos paralelos de AECA y pacientes. Además de la utilidad clínica por su correlación con la actividad de la enfermedad, es lógico concluir que un grupo de ELISA específico para AECA podría ser una herramienta diagnóstica confiable.

Referencias

1. Youinou P. Anti-endothelial cell antibodies and disease. Intern Med Clin Lab 1995;3:7-10
2. Del Papa N, Gambini D, Meroni PL. Anti-endothelial cell antibodies and autoimmune diseases. Clin Rev Allergy 1995;12:275-286
3. Meroni PL, D'Cruz D, Khamashta M, et al. Anti-endothelial cell antibodies: only for scientists of for clinicians too? Clin Exp Immunol 1996;104:199-202
4. Meroni PL, Youinou P. Endothelial cell antibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y editors. Autoantibodies. Amsterdam, Elsevier Science 1996:245-252
5. Balizna C, Cohen Tervaert JW. Specificity, pathogenicity and clinical value of anti-endothelial cell antibodies. Semin Arthritis Rheum 1997;27:89-109
6. Lindqvist KJ, Osterland CK. Human antibodies to vascular endothelium. Clin Exp Immunol 1970;9:753-760
7. Tan EM, Pearson CM. Rheumatic disease sera reactive with capillaries in the mouse kidney. Arthritis Rheum 1972;15:23-28
8. Cines DB, Lyss AP, Reeber M, et al. Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1984;73:611-625
9. Renaudineau Y, Pers JO, Youinou P. Anti-endothelial cell antibody and infection. In: Shoenfeld Y, Rose NR editors. Infection and autoimmunity, Amsterdam, Elsevier Science 2004:75-84
10. Youinou P, Meroni PL, Khamashta MA, et al. A need for standardization of the anti-endothelial cell antibody test. Immunol Today 1995;16:363-364
11. Fukuda Y, Nagura H, Imoto M, et al. Immunohistochemical studies on structural changes of the hepatic lobules in liver diseases. Am J Gastroentero1 1986;81:1149-1155
12. Yamamoto M, Shinokata K, Nagura H. An immunohistochemical study on phenotypic heterogeneity of human pulmonary vascular endothelial cells. Virchows Arch 1988;412:479-486
13. Tsutomu K, Takashi M, Miyake K, et al. Phenotypic heterogeneity of vascular endothelial cells in the human kidney. Cell Tissue Res 1989; 256:27-34
14. Page C, Rose M, Yacoub M, et al. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. Am J Patho1 1992;141:673-683
15. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymetry in blood cells. Blood 1997;89:1129-1132
16. Marllyama I. Biology of endothelium. Lupus 1998;7(suppl2):541-543.
17. Belmont HM, Abramson SB, Lie JT. Pathology and pathogenesis of vascular injury in SLE. Interactions of inflammatory cells and activated endothelium. Arthritis Rheum 1996;39:9-22
18. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998;91:3527-3561

19. Renaudineau Y, Grunebaum E, Krause I, et al. Antiendothelial cell antibodies in systemic sclerosis: increased sensitivity using different endothelial cell substrates and association with other autoantibodies. Autoimmunity 2004;33:171-179
20. Praprotnick S, Blank M, Meroni PL, et al. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells. Arthritis Rheum 2001;44:1484-1494
21. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Functional heterogeneity of pathogenic anti-endothelial cell antibodies. In: Shoenfeld Y, Harats D, Wick G editors. Atherosclerosis and autoimmunity. Amsterdam, Elsevier Science, 2001:211-220
22. Castillo S, Révélen R, Bordron A, et al. Antiendothelial cell reactivity, the unresolved enigma. Int J Immunopath Ph 2001;14:109-118
23. Hashemi S, Smith CD, Izaguirre CA. Anti-endothelial cell antibodies: detection and characterization using a cellular enzyme-linked immunosorbent assay. J Lab Clin Med 1987;109:434-440
24. Revelen R, Bordron A, Dueymes M, et al. False positivity in a cyto-ELISA for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins. Clin Chim 2000;46:273-278
25. Dugue C, Perraut R, Youinou P, et al. Effects of anti-endothelial cell antibodies in leprosy and malaria. Infect Immun 2004;72:301-309
26. Drouet C, Nisson MF, Ponard D, et al. Detection of anti-endothelial cell antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay using antigens from cell lysate: minimal interference with antinuclear antibodies and rheumatoid factors. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:934-939
27. Edge 11 CJS, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1983;80:3734-3737
28. van Leeuwen EBM, Wisman GBA, Cohen Tervaert JW, et al. An SV40 large T-antigen immortalized umbilical vein endothelial cell line for anti-endothelial cell antibody detection. Clin Exp Rheumatol 2001 ;19:283-290
29. Révélen R, d'Arbonneau F, Guillevin L, et al. Comparison of cell-ELISA flow cytometry and Western blotting for the detection of anti-endothelial cell antibodies. Clin Exp Rheumatol 2002;20:19-26
30. Heurkens AHM, Gorter A, de Vreede TM, et al. Methods for the detection of anti-endothelial antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods 1991;57:33-39
31. Westphal JR, Boerbooms AMTh, Schalkwijk CJM, et al. Anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with autoimmune diseases: comparison between ELISA and FACS analysis. Clin Exp Immunol 1994;96:444-449
32. Forsyth KD, Talbot V. Assessment of endothelial immunophenotype: limitation of flow cytometric analysis. J Immunol Methods 1991;144:93-99
33. Diraskeneli H, D'Cruz D, Khamashta MA, et al. Autoantibodies against endothelial cells, extracellular matrix and human collagen type IV in patients with systemic vasculitis. Clin Immunol Immunopathol 1994; 70:206-210
34. Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, et al. Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. Clin Exp Immunol 1988;72:450-456
35. Salojin KV, Le Tonquèze M, Saraux A, et al. Anti-endothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. Am J Med 1997;102:178-185
36. Renaudineau Y, Révélen R, Levy Y, et al. Antiendothelial cell antibodies in systemic sclerosis. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:156-160
37. Salojin KV, Le Tonquèze M, Nassonov EL, et al. Anti-endothelial cell antibodies in patients with various forms of vasculitis. Clin Exp Rheumatol 1996;14:163-169
38. Salojin KV, Bordron A, Nassonov EL, et al. Anti-endothelial cell antibody, thrombomodulin and von-Willebrand factor in idiopathic inflammatory myopathies. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:519-521
39. Ihn H, Sato S, Fujimoto Y, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic association with pulmonary fibrosis. Clin Exp Immunol 2000;119:203-209
40. D'Cruz DP, Haussiau FA, Ramirez G, et al. Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis. Clin Exp Immunol 1991:85:254-261
41. Heurkens AHM, Hiemstra PS, Lafeber GJM, et al. Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis. Clin Exp Immunol 1989;78:7-12
42. Cervera R, Ramírez G, Fernández-Sola J, et al. Antibodies to endothelial cells in dermatomyositis: association with interstitial lung disease. Br Med J 1991;302:880-881
43. Leung DYM, Collins T, Lapierre LA, et al. Immunoglobulin M antibodies in the acute phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated with gamma interferon. J Clin Invest 1986; 77:1428-1435
44. Leung DYM, Moake JL, Havens PL, et al. Lytic anti-endothelial cell antibodies in haemolytic-uraemic syndrome. Lancet 1988;333:183-186
45. Del Papa N, Meroni PL, Barcellini W, et al. Antibodies to endothelial cells in primary vasculitides mediate *in vitro* endothelial cytotoxicity in the presence of normal peripheral blood mononuclear cells. Clin Immunol Immunopathol 1992;63:267-274
46. Penning CA, Cunningham J, French MAH, et al. Antibody-dependent cytotoxicity of human endothelium as systemic sclerosis. Clin Exp Immunol l984;58:548-556
47. Holt CM, Lindsey N, Moult J, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of vascular endothelium: characterization and pathogenic associations in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol 1989;78:359-365
48. Navarro M, Cervera R, Font J, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. Lupus 1997;6;521-526
49. Boehme MWJ, Schmitt WH, Youinou P, et al. Clinical relevance of elevated serum thrombomodulin and soluble E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis and other systemic vasculitides. Am J Med 1996;101:387-394
50. Mendonça LLF, Khamasta MA, Cuadrado MJ, et al. Natural immune response involving anti-endothelial cell antibodies in normal and lupus pregnancy. Arthritis Rheum 2000;43:1511-1515
51. Direskeneli H, Buchanan NMM, Khamashta MA, et al. Markers of vascular damage in lupus pregnancy. Clin Exp Rheumatol 1997; 15:535-539
52. Roussev RG, Stem JJ, Keider BD. Anti-endothelial cell antibodies: another cause for pregnacy loss. Am J Reprod Immunol 1998;39:89-95
53. Damianovich M, Gilburd B, George J, et al. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in vasculitis: an idiotypic experimental model. J Immunol 1996;4946-495
54. Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation: a central pathophysiological process. Brit Med J 1998;316:1328-1329
55. Howathova M, Jahnova E, Nyulassy S. Detection of antiendothelial cell antibodies in patients with connective tissue diseases by flow cytometry and their relation to endothelial cell activation. Physiol Res 2OO2;51:613-617
56. Del Papa N, Guidali L, Sironi M, et al. Anti-endothelial cell IgG antibodies form patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cell *in vitro* and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. Arthritis Rheum 1996;39:758-792
57. Bordron A, Revelen R, d'Arbonneau F, et al. Functional heterogeneity of anti-endothelial antibodies. Clin Exp Immunol 2001;124:492-501
58. Carvalho D, Savage COS, Black CM, et al. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells *in vitro*. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J Clin Invest 1996;97:111-119
59. Carvalho D, Savage COS, Isenberg D, et al. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulates the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. Arthritis Rheum 1999;42:631-640
60. Ihrcke NS, Platt JL. Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cell: evidence for proteolysis of cell-surface molecules. J Cell Physiol 1996;168:625-637
61. Westlin WF, Gimbrone MA. In neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Am J Patho1 1993;142:117-128
62. Hashimoto Y, Nakano K, Yoshinoya S, et al. Endothelial cell destruction by polymorphonuclear leukocytes incubated with sera from patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Rheumatol 1992;21:209-214
63. Blann AD, Illingworth K, Jayson MIV. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. J Rheumatol 1993;120:1325-1330
64. Tannenbaum SH, Finko R, Cines DB. Antibody and immune complexes induce tissue factor production by human endothelial cells. J Immunol 1986;137:1532-1537
65. Kornberg A, Renaudineau Y, Blank M, et al. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies and anti-endothelial cell antibodies induce tissue factor in endothelial cells. IMAJ 2002;2(supplement):27-31
66. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become coagulant. Blood 1997;89:2229-2242
67. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood 1997;89:2429-2442
68. George J, Harats D, Gilburd B, et al. Atherosclerosis-related markers in systemic lupus erythematosus: the role of humoral immunity in enhanced atherogenesis. Lupus 1999;8:220-226
69. George J, Harats D, Gilburd B, et al. Immunolocalization of b2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques. Potential implications for lesion progression. Circulation 1999;99:2227-2230

70. Zurgil N, Levy Y, Deutsch M, et al. Reactivity of peripheral blood lymphocytes to oxidized low-density lipoproteins: a novel system to estimate atherosclerosis employing the cellscan. Clin Cardiol 1999; 22:526-532
71. Shoenfeld Y, Harats D, George J. Atherosclerosis and the antiphospholipid syndrome: a link unravelled? Lupus 1998;7(suppl2):S140-S143
72. Del Papa N, Guidali L, Sala A, et al. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum, 1997;40:551-561
73. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Antiendothelial cell antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome. Autoimm 1991;Il:l-6
74. Sgonc R, Gruschwib MS, Dietrich H, et al. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic even underlying skin lesions in avian and human scleroderma. J Clin Invest 1996;98:785-792
75. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, et al. The binding of some anti-endothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. J Clin Invest 1998;101:2029-2035
76. Nguyen VA, Sgonc R, Dietrich H, et al. Endothelial injury in internal organs of university of California at Davis 200 chickens, as an animal model for systemic sclerosis. J Autoimmun 2000;14:143-149
77. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chroriollantoic membrane assay. Arthritis Rheum 2003;48:2605-2614
78. Lin YS, Lin CF, Lei HY, et al. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. Curr Pharm Des 2004;10:213-221
79. Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Argiielles A. The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. J Autoimmun 1996;9:295-300
80. Williams RC Jr, Peen E. Apoptosis and cell penetration by autoantibody may represent linked processes. Clin Exp Rheumatol 1999; 17:643-647
81. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Uwatoko S, et al. Increase of cytokine production by pulmonary artery endothelial cells induced by supernatants from monocytes stimulated with autoantibodies against U1-ribonucleoprotein. Clin Exp Rheumatol 1999;17:705-712
82. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, et al. Dengue virus infection of human endothelial cell leads to chemokine production complement activation and apoptosis. J Immunol 1998;161:6338-6346
83. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Brit Med Bull 1997;53:491-508
84. Leung DYM, Geha RS, Newburger JW, et al. Two monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during Kawasaki syndrome. J Exp Med 1986;l64(6):1958-1972
85. Dang CT, Magid MS, Weksler B, et al. Enhanced endothelial cell apoptosis in splenic tissues of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 1999;93:1264-1270
86. George F, Poncelet P, Laurent JC, et al. Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. J Immunol Methods 1991;139:65-75
87. Clancy R, Warder G, Martin V, et al. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus. Further evidence for diffuse vasculopathy. Arthritis Rheum 2001;44:1203-1208
88. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. Blood 2004;103:3677-3683
89. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, et al. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. Lancet 2003;361:206-210
90. Del Papa N, Colombo G, Frachiolla N, et al. Circulating endotelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. Arhtritis Rheum 2004;50: 1296-1304
91. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, et al . Anti-endothelial cell antibody binding makes negatively charged phospholipids accessible to anti-phospholipid antibodies. Artritis Rheum 1998;41:1738-1747
92. Del Papa N, Sheng YH, Raschi E, et al. Human 82 glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipid binding and offers epitopes for anti-82 glycoprotein I antibodies. J Immunol 1998;160:5572-5578
93. Del Papa N, Guidali L, Sala A, et al. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-82 glycoprotein I antibodies react *in vitro* with endothelial cells through adherent 82 glycoprotein I and induce endothelial activation. Arthritis Rheum 1997;40:551-561
94. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Antiphospholipid/endothelial cell interaction in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. 1n: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld editors. The antiphospholipid syndrome II: autoimmune thrombosis. Amsterdam, Elsevier Science, 2002:79-89
95. Lanir N, Zilberman M, Yron I, et al. Reactivity patterns of antiendothelial cells: effect of antiendothelial antibodies on cell migration. J Lab Clin Med 1998;131:548-556
96. Hanly JG, Hong C, Issekub A. 82 glycoprotein I and anticardiolipin antibody binding to resting and activated cultured human endothelial cells. J Rheumatol 1996;23:1543-1549
97. Ronda N, Haury M, Nobrega A, et al. Analysis of natural and disease-associated auto-antibody repertoires: antiendothelial cell IgG autoantibody activity in the serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. In Immunol 1994;6:1651-1660
98. Pittoni V, Ravirajan CT, Donohoe S, et al.. Human monoclonal antiphospholipid antibodies bind to membrane phospholipids and a cryptic epitope of b2-glycoprotein I on apoptotic cells [abstract]. Arthritis Rheum 1998;41 (supplement) 12:S166
99. Le Tonqueze M, Salojin KY, Dueymes M, et al. Role of b2-glycoprotein I in the antiphospholipid antibody binding to endothelial cells. Lupus 1995;4:179-186. 100
100. Simantov R, Lasala J, Lo SK, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. JClin Invest 1995;96: 2211-2219
101. Del Papa N, Meroni PL, Tincami A, et al. Relationship between antiphospholipid and anti-endothelial cell antibodies: further characterization of the reactivity on resting and cytokine-activated endothelial cells. Clin Exp Rheumatol 1992;10:37-42
102. Del Papa N, Guidali L, Sala A, et al. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies. Human polyclonal and monoclonal anti-b2-glycoprotein I antibodies react *in vitro* with endothelial cells through adherent b2-glycoprotein I and induce endothelial activation. Arthritis Rheum 1997;40:551-561
103. Hill MB, Phipps JL, Hughes P. Anti-endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE: patterns of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes. Brit J Haematol 1998;703:416-421
104. McCrae KR, DeMichele A, Samuels P, et al. Detection of endothelial cell-reactive immunoglobulin in patients with anti-phospholipid antibodies. Brit J Haematol 1991;79:595-605
105. Le Tonqueze M, Salojin KV, Dueymes M, et al. Antiphospholipid antibodies partly account for antiendothelial cell reactivity. Now Rev Fr Hematol 1995;37(suppl II):561-564
106. Shoenfeld Y. Etiology and pathogenetic mechanisms of the antiphospholipid syndrome unraveled. Trends Immunol2003;24:2-4
107. Moraes JR, Stastney P. A new antigen system expressed in human endothelial cells. J Clin Invest 1977;60:449-454
108. Schook LB, Wood N, Mohanakumar T. Identification of human vascular endothelial cell/monocyte antigenic systemic using monoclonal antibodies. Transplantation 1987;44:412-416
109. Wood NL, Schook LB, Studer EJ, et al. Biochemical characterization of human vascular endothelial cell-monocyte antigens defined by monoclonal antibodies. Transplantation 1988;45:787-792
110. Kaneko K, Savage CO, Pottinger BE, et al. Anti-endothelial cell antibodies can be cytotoxic to endothelial cells without cytokine prestimulation and correlate with ELISA antibody measurement in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 1994;98(2):264-269
111. Fujieda M, Oishi N, Kurashige T. Antibodies to endothelial cells in Kawasaki disease lyse endothelial cells without cytokine pretreatment. Clin Exp Immunol 1997;107:120-126
112. Nash MC, Shah V, Reader JA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and anti-endothelial cell antibodies are not increased in Kawasaki disease. Br J Rheumatol 1995;34:882-887
113. Guzman J, Fung M, Petty RE. Diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic and anti-endothelial cell antibodies in early Kawasaki disease. J Pediatr 1994;124:917-920
114. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. Immunol Today 1997;18:231-240
115. Koenig DW, Barley-Maloney L, Daniel TO. A Western blot assay detects autoantibodies to cryptic endothelial antigens in thrombotic microangiopathies. J Clin Immunol 1993;13:204-211
116. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, et al. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. Clin Exp Immunol 1996;106:491-497
117. Del Papa N, Conforti G, Gambini D, et al. Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis. Clin Immunol Immunopathol 1994;70:211-216
118. Levy Y, Gilburd B, George J, et al. Characterization of murine monoclonal antiendothelial cell antibodies (AECA) produced by human manipulation with human AECA. Int Immunol 1998;10:861-868
119. Garcia de la Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, et al. IgG reactivity with a 100-kDa tissue and endothelial cell antigen identified as topoisomerase 1 distinguishes between limited and systemic sclerosis patients. Clin Immunol 2004;111:241-251

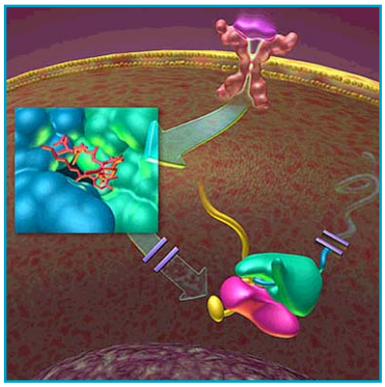
120. van der Zee JM, Heurkens AH, van der Voort EA, et al. Characterization of anti-endothelial antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis. Clin Exp Rheumatol 1991;9:589-594
121. Chan TM, Frampton G, Staines NA, et al. Different mechanisms by which anti-DNA MoAbs bind to human endothelial cells and glomerular mesangial cells. Clin Exp Immunol 1992;88:68-74
122. Hill MB, Philipps JL, Malia RG, et al. Characterization and specificity of anti-endothelial cell membrane antibodies and their relationship to thrombosis in primary antiphospholipid syndrome. Clin Exp Immunol 2001;126:345-354
123. Manning T, Smoller BR, Horn TD, et al. Evolution of anti-trombomodulin antibody as a tumor marker in vascular neoplasms. J Cutan Patho1 2004;31:652-656
124. Shibata S, Harpel PC, Gharavi A, et al. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin 111-thrombin complexes. Blood 1994; 83:2532-2540
125. Kramers C, Termaat RM, ter Borg EJ, et al. Higher anti-heparan sulfate reactivity during systemic lupus erythematosus disease exacerbations with renal manifestations: a long-term prospective analysis. Clin Exp Immunol 1993;93:34-38
126. Renaudineau Y, Revelen R, Bordron A, et al. Two populations of endothelial cell antibodies cross-react with heparin. Lupus 1998;7:86-94
127. Dimitriu-Bona A, Matic M, Ding W, et al. Cytotoxicity to endothelial cells by sera from aged MRL lpr/lpr mice is associated with autoimmunity to cell surface heparan sulfate. Clin Immunol Immunopathol 1995;70:234-240
128. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, et al. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. Blood 1993;82:1221-1229
129. Mayet WJ, Meyer Zum Buschenfelde KH. Antibodies proteinase 3 increases adhesion of neutrophils to endothelial cells. Clin Exp Immunol 1993;94:440-446
130. Mayet WJ, Schwarting A, Meyer Zum Buschenfelde KH. Cytotoxic effects of antibodies to proteinase 3 on human endothelial cells. Clin Exp Immunol 1994;97:458-465
131. Savage COS, Gaskin G, Pusey CD, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) can recognize vascular endothelial cell-bound ANCA-associated antigens. Exp Nephrol 1993;l:190-195
132. King WJ, Adu D, Daha MR, et al. Endothelial cells and renal epithelial cells do not express the Wegener's autoantigen, proteinase 3. Clin Exp Immunol 1995;102:98-105
133. Lee KH, Chung HS, Kim HS, et al. Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease. Arthritis Rheum 2003;48:2025-2035
134. Tripathy NK, Sinha N, Nityanand S. Anti-annexin V antibodies in Takayasu's arteritis: prevalence and relationship with disease activity. Clin Exp Immunol 2003;134:360-364
135. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, et al. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. Am J Hematol 1994;47:56-58
136. Nakanuva N, Ban T, Yamaji K, et al. Localization of the apoptosis-inducing activity of lupus anticoagulant in an annexin V-binding antibody subset. J Clin Invest 1998;101:1951-1959
137. Wheeler CH, Collins A, Dunn MJ, et al. Characterization of endothelial antigens associated with transplant-associated coronary artery disease. J Heart Lung Transplant 1995;14:S188-S197
138. Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, et al. Antiendothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. Lancet 1992; 339:1566-1568
139. Margutti P, Delunardo F, Sorice M, et al. Screening of a HUVEC cDNA library identifies actin as a candidate autoantigen associated with carotid atherosclerosis. Clin Exp Immunol 2004;137:209-215
140. Yoshio T, Masuyama J, Kano S. Antiribosomal PO protein antibodies react with the surface of human umbilical vein endothelial cells. J Rheumatol 1996;23:1311-1312
141. Sedmak DD, Davis DH, Singh U, et al. Expression of IgG Fc receptor antigens in placenta and on endothelial cells in humans. An immunohistochemical study. Am J Patho1 1991;l38:175-181
142. Taekema-Roelvink MEJ, van Kooten C, Heenskerk E, et al. Proteinase 3 interacts with a 111-kD membrane molecule of human umbilical vein endothelial cells. J Am Soc Nephrol 2000;11:640-648
143. Svenungsson RWE, Gunnarsson I, Haegerstrand-Gillis C, et al. Antibodies to adult human endothelial cells cross-react with oxidized low-density liproprotein and b2 glycoprotein I in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 1999;115:561-566
144. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. Nature 1997;386:73-77
145. Cominacini L, Gabin U, Fratta Pasini A, et al. Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intracellular reactive oxygen species in endothelial cells: inhibitory effects of lacidipine. J Hypertens 1998;16:1913-1919
146. Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kannido H, et al. Oxidized low density liproprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. J Biol Chem 1998; 273:9681-9687
147. Chan TM, Cheng IKP. Identification of endothelial cell membrane proteins that bind anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus by direct mechanisms. J autoimmune 1997; 10:433-439
148. Chan TM, Yu PM, Tsang KLC, et al. Endothelial cell binding by human polyclonal anti-DNA antibodies: relationship to disease activity and endothelial functional alterations. Clin Exp Immunol 1995;100:506-513
149. Li JS, Liu MF, Lei HY. Characterization of anti-endothelial cell antibodies in the patients with systemic lupus erythematosus: a potential marker for disease activity. Clin Immunol Immunopathol 1996;79:211-216
150. Lai KN, Leung JCK, Lai KB, et al. Upregulation of adhesion molecule expression on endothelial cells by anti-DNA autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1996;81:229-238
151. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Uwatoko S, et al. Endothelial cell-binding activity of anti-U1-ribonucleoprotein antibodies in patients with connective tissue diseases. Clin Exp Immunol 2001;126:345-354
152. Blank M, Shoenfeld Y, Tavor S, et al. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. Int Immunol 2002;14:121-129
153. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med 1994;179: 1317-1330
154. Ferry H, Jones M, Vaux DJ, et al. The cellular localization of self-antigen determines the positive and negative selection of autoreactive B cells. J Exp Med 2003;198:1415-1425
155. Le Tonqueze M, Jamin C, Bohme M, et al. Establishment and characterization of permanent human endothelial cell clones. Lupus l996; 5:103-112
156. Rock G, Chauhan K, Jamieson GA, et al. Anti-CD38 antibodies in patients with lupus anticoagulant and thrombotic complications. Brit J Haematol 1994;88:878-880
157. Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, et al. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 *in vivo* and *in vitro*. J Immunol 1992;148:78-83
158. Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, et al. Endothelin-1 release from cultured endothelial cell by sera from patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1995;54:361-365
159. Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, et al. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. Blood 2004;103:4164-4172
160. Volkel T, Muller R, Kontermann RE. Isolation of endothelial cell-specific human antibodies from a novel fully synthetic scFv Library. Biochem Biophys Res Commun 2004;317:515-521
161. Dieude M, Seneca1 JL, Raymond Y. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell-positive systemic lupus erythematosus patients. Arthritis Rheum 2004;50:3221-3231
162. Bason C, Corroche R, Lunardi C, et al. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. Lancet 2003;362:1971-1977
163. Xu Q, Schett G, Seitz CS, et al. Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells. Cir Res 1994;75:1078-1085
164. Brasile L, Kremer JM, Clarke JL. Identification of an autoantibody to vascular endothelial cell-specific antigens in patients with systemic vasculitis. Am J Med 1989;87:74-80
165. Ferraro G, Meroni PL, Tincani A, et al. Anti-endothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis. Clin Exp Immunol 1990;79:47-53
166. Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, et al. Autoantibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. Clin Exp Immunol 1990;82:227-232
167. Chan TM, Frampton G, Wayne DRW, et al. Clinical significance of anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis: a longitudinal study comparing anti-endothelial cell antibodies and anti-neutrophil cytoplasm antibodies. Am J Kidney Dis 1993;22:387-392
168. Schmitt WH, Csernok E, Kobayashi S, et al. Churg-Strauss syndrome: serum markers of lymphocyte activation and endothelial damage. Arthirtis Rheum 1998;41:445-452
169. Yashio T, Masuyama J, Sumiya M, et al. Anti-endothelial cell antibodies and their relation to pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1994;21:2058-2063

170. Aydintung AO, Tokgoz G, D'Cruz DP, et al. Antibodies to endothelial cells in patients with Behçet's disease. Clin Immunol Immunopathol 1993;67:157-162
171. Rizzi R, Numo R, Bruno S, et al. Anti-endothelial cell antibodies in Behçet's disease. Eur J Intern Med 1997;8:237-241
172. Walker TS, Triplett DA. Serologic characterization of Rocky Mountain spotted fever. Appearance of antibodies reactive with endothelial cells and phospholipids, and factors that alter protein C activation and prostacyclin secretion. Clin Microbiol Infect Dis 1991;95:725-732
173. Cacoub P, Ghillani P, Revelen R, et al. Antiendothelial cell autoantibodies in hepatitis C virus mixed cryoglogulinemia. J Hepatol l999; 31:598-603
174. Dinc A, Takafuta T, Jiang D, et al. Anti-endothelial cell antibodies in Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 2003;21(suppl30):S27-S30
175. Raife TJ, Atkinson B, Aster RH, et al. Minimal evidence of platelet and endothelial cell reactive antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. Am J Hematol 1999;62:82-87
176. Nash MC, Shah V, Reader JA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and anti-endothelial cell antibodies are not increased in Kawasaki disease. Br J Rheumatol 1995;34:882-887
177. Jones DB, Wallace R Frier BM. Vascular endothelial cell antibodies in diabetic patients: association with diabetic retinopathy. Diabetes Care 1992;15:552-555
178. Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, et al. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. Transpl Immunol 1998;6:101-106
179. Faulk WP, Rose M, Meroni PL, et al. Antibodies to endothelial cells identify myocardial damage and predict development of coronary artery disease in patients with transplanted hearts. Hum Immunol 1999;60:836-832
180. Frances C, Le Tonqueze M, Salojin KV, et al. Prevalence of antiendothelial cell antibodies in patients with Sneddon's syndrome. J Am Acad Dermatol 1995;33:64-68
181. Assier H, Chosidov O, Piette JC, et al. Absence of antiphospholipid and anti-endothelial cell antibodies in malignant atrophic papulosis: a study of 15 cases. J Am Acad Dermatol 1995;33:831-833
182. Eichhorn J, Sima D, Thiele B, et al. Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. Circulation 1996;94:2396-2401
183. Edelsten C, D'Cruz D, Hughes GRV, et al. Anti-endothelial cell antibodies in retinal vasculitis. Curr Eye Res 1992;11:203-208
184. Eichhorn J, Sima D, Lindschau C, et al. Anti-endothelial cell antibodies in thromboangiitis obliterans. Am J Med Sci l998;315:17-23
185. Stevens TRJ, Harley SL, Groom JS, et al. Anti-endothelial cell antibodies in inflammatory lowel disease. Dig Dis Sci 1993;38:426-432
186. Rappaport VJ, Hirata G, Yap KH, et al. Anti-vascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1990; 162:138-146
187. Yap HK, Sakai RS, Bahn L, et al. Anti-vascular endothelial cell antibodies in patients with IgA nephropathy: frequency and clinical significance. Clin Immunol Immunopathol 1988;49:450-462
188. Lassalle P, Gosset P, Gruart V, et al. Presence of antibodies against endothelial cells in the sera of patients with episodic angioedema and hypereosinophilia. Clin Exp Immunol 1990;82:38-43
189. Wangel AG, Temonen M, Brummer-Korvenkontio M, et al. Anti-endothelial cell antibodies in nephropathia epidemica and other viral diseases. Clin Exp Immunol 1992;90:13-17
190. Krause I, Blumenfeld Z, Malchinsky M, et al. Anti-endothelial cell antibodies in the sera of hyperprolactinemic women. Lupus 1998;7: 377-382
191. Frostegird J, Wu R Gillis-Haegerstrand C, Lemne C, et al. Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. Circulation 1998;98: 1092-1098
192. Bodolay E, Csipo I, Gal I, et al. Anti-endothelial cell antibodies in mixed connective tissue disease: frequency and association with clinical symptoms. Clin Exp Rheumatol 2004;22:409-415
193. Aron GJ, Levy Y, Gilburd B, et al. Anti-cardiolipin, anti-endothelial cell and anti-malondialdehyde-LDL antibodies in uremic patients undergoin hemodialysis: relationship with vascular access thrombosis and thromboembolic events. Hum Antibodies 1999;9:125-131
194. van Haelst PL, Kobold AC, van Doormaal JJ, et al. AECA and ANCA in patients with premature atherosclerosis. Int Rev Immunol 2002; 21:19-26
195. Amor-Dorado JC, García-Porrua C, González-Gay MA. Anti-endothelial cell antibodies and biopsy-proven temporal arteritis. Lupus 2002;ll:134
196. Guillet G, García C, Sassolas B, et al. Anticorps anti-cellules endotheliales dans l'ulche chronique de jambes: prevalence et signification. Ann Dermatol Venereol 2001;128:1301-1304
197. Cadoni G, Agostino S, Manna R, et al. Clinical associations of serum antiendothelial cell antibodies in patients with sudden sensorineural hearing loss. Laryngoscope 2003;113:797-801
198. Zhou SF, Wang XM, Zhong HP, et al. Pathogenic role of anti-vascular endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. Chim Med J 1989;102:505-509
199. Yu HS, Chang KL, Kao YH, et al. *In vitro* cytotoxicity of IgG antibodies on vascular endothelial cells from patients with peripheral vascular disease in Taiwan. Atherosclerosis 1998;137:141-147
200. Youinou P, Revelen R, Bordron A. Is anti-endothelial cell antibody the murder weapon in systemic sclerosis? Clin Exp Rheumatol 1999; 17:35-36

14

HORMONAS, AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Luis J. Jara
Miguel A. Saavedra



Contenido

Hormonas y el sistema inmune
Sistema inmuno-neuro-endocrino
Estrógenos, andrógenos y sistema inmune
Prolactina y sistema inmune
Prolactina y LES
Aspectos terapéuticos

Las hormonas son factores significativos en la homeostasis y regulación del sistema inmune, y juegan un rol importante en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. El papel que juegan los estrógenos, los andrógenos y la prolactina, entre otras hormonas, en la modulación de la respuesta inmune son cada vez más conocidos, y al mismo tiempo son objeto de investigación como posibles blancos terapéuticos en el manejo de diversas enfermedades autoinmunes. El propósito del presente capítulo es proporcionar las evidencias del papel de estas hormonas en la respuesta inmune y de la interacción inmuno-neuroendocrina en la patogenia de las enfermedades autoinmunes.

Introducción

Desde principios del siglo pasado, los patólogos observaron que la extirpación quirúrgica de glándulas endocrinas (gónadas, adrenales, pituitaria), causaba atrofia de órganos linfoides, especialmente el timo. Sin embargo la metodología usada era insuficiente y primitiva por lo que la idea de la regulación inmune por las hormonas y la comunicación inmuno neuro endocrina cayó en desprestigio (1).

En 1948, Hench (2) y colaboradores, en la Clínica Mayo descubrieron los esteroides y su aplicación terapéutica en artritis reumatoide (AR). Estos descubrimientos reconocidos como hallazgos farmacológicos, constituyen ahora una sólida evidencia del control fisiológico de las hormonas sobre el sistema inmune.

Actualmente se considera que la comunicación entre el sistema nervioso, endocrino e inmune tiene una sólida base molecular. Los mensajeros de esta comunicación bidireccional son las citoquinas, las hormonas, los neuropéptidos y los neurotransmisores, los cuales tienen efecto endocrino, paracrino y autocrino. Diversas citoquinas influyen positiva o negativamente en la síntesis y secreción de hormonas. A su vez, la glándula pituitaria y las glándulas sexuales tienen la capacidad de regular la función inmune a través de hormonas. Esta comunicación se lleva a cabo por medio de receptores y por la capacidad que tienen estas células de sintetizar estas moléculas (3, 4).

Los estrógenos, la progesterona, los andrógenos y la prolactina afectan la respuesta inmune, y participan en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes especialmente en el lupus eritematoso sistémico (LES) (5,6). El propósito de este capítulo será proporcionar evidencias del papel de estas hormonas en la respuesta inmune y de la interacción inmuno-neuroendocrina en la patogenia de las enfermedades autoinmunes.

Respuesta inflamatoria/ inmune y el sistema inmuno neuro endocrino

La respuesta inflamatoria del organismo inducida por agentes infecciosos, autoantígenos, traumatismos, etc. se caracteriza por una compleja interacción entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino que tiene como objetivo mantener la homeostasis a nivel molecular. Las células del sistema inmune expresan mRNA, sintetizan y expresan receptores para hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores. Por otro lado, las células del sistema neuroendocrino (astrocitos, células gliales y células de la pituitaria) sintetizan y expresan receptores para citoquinas. Esta comunicación bidireccional se hace evidente bajo situaciones de estrés y en padecimientos inflamatorios/autoinmunes (7).

La respuesta inflamatoria local es orquestada por una red de sustancias, las cuales incluyen citoquinas, prostaglandinas, radicales libres y hormonas producidas en el sitio de la inflamación. La interleuquina-1β (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) inducen la producción de factores quimiotácticos, enzimas, una segunda "ola" de citoquinas (IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, interferon-α, interferon-β, etc), y la expresión de moléculas de adhesión y selectinas en las células endoteliales (8). Diversas hormonas producidas localmente como hormona liberadora de corticotrofina (CRH), arginina-vasopresina (AVP), prolactina (PRL) y sustancia P, están comprometidas en la regulación de esta respuesta inmune (9). Los procesos de contraregulación desencadenados para detener la inflamación están constituidos por citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13) y neuropéptidos (ACTH, β-endorfina, somatostatina y hormona estimuladora de α-melanocito (α-MSH)) (10).

La liberación de IL-1β, IL-6 y TNF-α desde el sitio de la inflamación hacia el torrente sanguíneo altera el metabolismo hepático y la expresión genética de los reactantes de fase aguda, conduciendo a la síntesis de estos reactantes. Estas citoquinas envían señales al sistema nervioso central (SNC), vía nervio vago o atraviesan la barrera hematoencefálica, iniciando una cascada de reacciones en el SNC. El control de la temperatura por el hipotálamo se altera y la temperatura corporal se incrementa generando una respuesta febril. La actividad del sistema nervioso simpático aumenta, se inician conductas biológicas adaptativas y se dispara la repuesta neuroendocrina a través de CRH, con liberación de ACTH y posteriormente, cortisol con el objeto de detener y limitar el proceso inflamatorio, cerrándose así la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino. De esta manera, la integridad del sistema inmune neuroendocrino es esencial para la apropiada modulación de la respuesta inmune (11-13) (Figura 1).

Estas complejas respuestas adaptativas son denominadas respuestas al estrés y son ejecutadas por los llamados sistemas de respuesta al estrés (14) que son los siguientes:

1. Sistema Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HAA): CRH-ACTH-cortisol
2. Sistema Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas: LHRH-FSH-LH-esteroides sexuales
3. Sistema Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides: TRH-TSH-hormonas tiroideas.
4. Sistema Hipotálamo-Prolactina-Hormona del crecimiento

La mayoría de las enfermedades autoinmunes son mas frecuentes en mujeres que en hombres. Estas enfermedades se presentan o se activan durante periodos de cambios profundos en el desarrollo biológico como la pubertad, la menstruación, el embarazo, el posparto, la menopausia o en fases de estrés psicológico. Estas situaciones se asocian con cambios en la síntesis y liberación de CRH, ACTH, cortisol, LHRH, LH, esteroides sexuales, PRL y otras hormonas, sugiriendo una anormalidad intrínseca de los ejes de respuesta al estrés. Estas alteraciones pueden participar en forma directa e indirecta en la patogénesis y la expresión clínica de las enfermedades reumáticas autoinmunes (15-17).

Esta hipótesis se apoya en estudios realizados en modelos experimentales. En artritis inducida por adyuvante

(AA) se ha demostrado que las ratas Lewis, desarrollan artritis experimental muy parecida a la AR, después de la inyección de peptidoglucanos extraídos de estreptococo. En contraste, las ratas Fisher, bajo el mismo estímulo, no desarrollan artritis. Esta diferencia se debe a una incapacidad innata del eje HHA de las ratas Lewis para liberar glucocorticoides endógenos, debido a una ausencia de síntesis de CRH por el hipotálamo. Este defecto no está presente en las ratas Fisher. El fallo de respuesta al estrés por falta de CRH, favorece la amplificación de la respuesta inmunológica e inflamatoria (18).

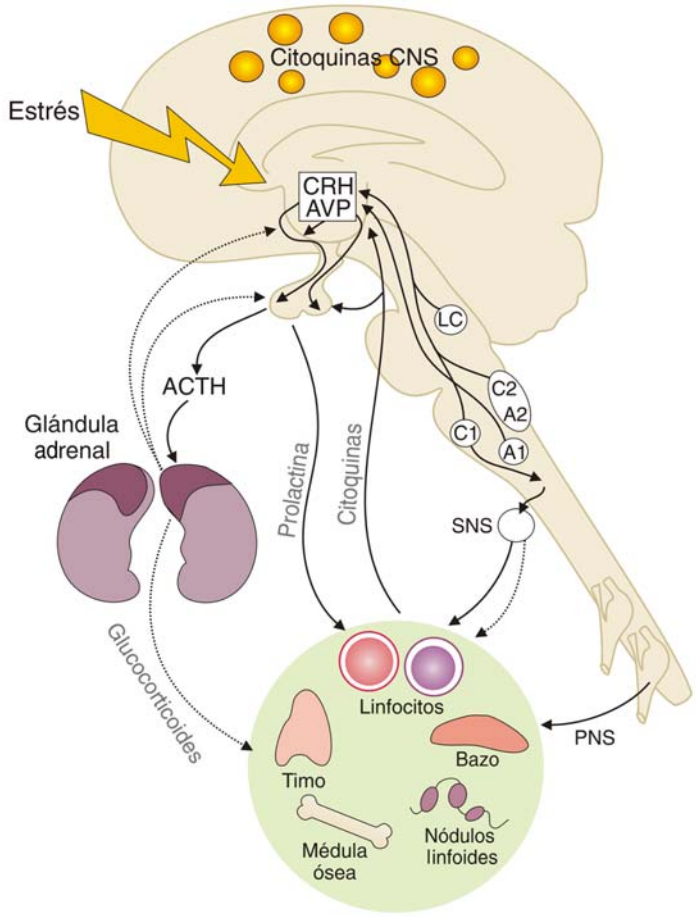


FIGURA 1.
Comunicación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune.
Las rutas de comunicación incluyen el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal, sistema nervioso simpático (SNS) y parasimpático (PNS) y los mensajeros son CRH, vasopresina (AVP), ACTH, glucocorticoides, citoquinas y prolactina (Adaptado de ref. 7).

Estrógenos, andrógenos y sistema inmune.

Estrógenos

El papel de los estrógenos en la modulación de la respuesta inmune es un área importante de investigación. Los niveles de estrógenos cambian a través de la vida de una mujer y estos cambios están unidos a una elevada incidencia de enfermedades autoinmunes. Los estrógenos (E) son esteroides aromatizados C18, sintetizados en las gónadas y el tejido adiposo por aromatización de testosterona o aromatización de androstenediona a estrona seguido por su reducción a estradiol. El E mas potente es 17-β- estradiol (5).

Diversos estudios *in vitro* y en modelos experimentales indican que los E tienen efecto directo sobre los monocitos y macrófagos, disminuyendo la producción de las citoquinas Th1: IL-1, IL-6 y TNFα y de IL-2. Adicionalmente, el 17-β- estradiol parece estimular la producción de IFN-γ, IL-5 e IL-10 conduciendo a un predominante perfil de citoquinas Th2, consistente con una producción excesiva de autoanticuerpos. Los E mientras que por un lado suprimen la función de los linfocitos T, parecen apoyar la sobrevivencia de linfocitos B. Estos hallazgos son consistentes con las observaciones de inmunosupresión mediada por células e incremento de la inmunidad humoral observada durante el embarazo, el cual se caracteriza por una elevada relación estrógenos: Progesterona (19-22). Los E también parecen modular la señal de transducción de linfocitos a través del efecto sobre la calcineurina (5).

La modulación del sistema inmune por el 17-beta-estradiol se lleva a cabo por medio de los receptores de E. Existen 2 receptores de E: el receptor α (ERα) y el ERβ (7). Se han descrito polimorfismos en el gen del receptor ERα en humanos que constituyen una predisposición genética para el desarrollo de glomerulonefritis lúpica. En apoyo a estos hallazgos un estudio reciente demuestra que los ratones que carecen de ERα (ERα -/-) pero no los que carecen de ERβ desarrollan glomerulonefritis con la presencia de anticuerpos anti-DNA positivo, sumado con infiltración de linfocitos B en el riñón y formación espontánea de centros germinales en el bazo en ausencia de estímulo antigénico. Estos resultados indican que el ERα tiene una función importante en el riñón y un defecto genético de estos receptores puede resultar en glomerulonefritis autoinmune (23). Los E pueden modular la liberación de citoquinas inducida por activación de macrófagos a través de la regulación del receptor CD16. En ausencia de E, se observó un notable incremento en la expresión del receptor CD16 y un incremento significativo de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β e IL-6) (24)

Andrógenos

El efecto inmunomodulador de los andrógenos está bien sustentado. Los andrógenos incrementan la producción de IL-2 y suprimen la formación de autoanticuerpos aunque no está claro si es por un efecto directo sobre los linfocitos B o mediado a través de linfocitos T (25).

En humanos con AR se ha demostrado también una inadecuada producción de corticoides y niveles bajos de dehidroepiandrosterona (DHEA) sulfatada en relación con la gravedad de la enfermedad (26).

En hombres y mujeres con LES se ha demostrado un estado hiperestrogénico caracterizado por niveles elevados de 16 α hidroxiestrona. Este metabolito feminizante,

tiene la capacidad de unirse a eritrocitos y linfocitos y esta unión vía receptor puede resultar en una alteración del sistema inmune. También se ha demostrado una oxidación acelerada de testosterona con la consecuente disminución de andrógenos en mujeres con LES (27).

Prolactina y sistema inmune

En 1930, Smith (1) observó que después de la hipofisectomía, el timo de las ratas dejó de crecer y disminuyó a menos de la mitad de su peso comparado con los controles. Probablemente esta es la primera observación que sugiere un papel de la PRL en la fisiología del timo. Muchos años después, los trabajos pioneros de Berczi y colaboradores contribuyeron notablemente al conocimiento del papel de la PRL usando el modelo experimental de AA. En estos experimentos se demostró que la PRL restauraba la respuesta inmune en ratas hipofisectomizadas. El tratamiento de estas ratas con Bromocriptina (BRC), un inhibidor dopaminérgico de la síntesis de PRL, produjo una respuesta inmune disminuida al estímulo cutáneo con dinitroclorobenzeno, AA, encefalitis alérgica experimental y formación de anticuerpos (28). Esta inhibición de la respuesta inmune es recuperada por la adición de PRL. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el papel de la PRL en estos modelos experimentales, es el incremento de la actividad de la Ornitina Descarboxilasa (ODC), la primera enzima comprometida en la biosíntesis de poliaminas, la cual ocurre en forma paralela a la elevación de PRL, 3 a 4 días después de la inyección del adyuvante completo de Freund. De hecho, la PRL estimula la expresión del gen de la ODC y de otros genes relacionados con la proliferación de las células del sistema inmune (29, 30).

Producción de prolactina por células del sistema inmune

Hiestand y col. (31) fueron los primeros en demostrar que las células del sistema inmune eran capaces de expresar mRNA para PRL. El siguiente paso fue dado por Montgomery y col, quienes demostraron que los linfocitos sintetizaban moléculas semejantes a PRL, las cuales eran inmunoreactivas (identificada con anticuerpo anti-PRL hipofisiaria) y bioactivas (con actividad proliferativa sobre las células Nb2 de linfoma). Tres formas principales de PRL son sintetizadas y secretadas por los cultivos de timocitos humanos: 24, 21 y 11 kDa. Las células mononucleares sintetizan una PRL de 27 kDa y las células T (Jurkat) sintetizan una PRL de 25 kDa (32). Los linfocitos B también son capaces de sintetizar y secretar PRL idéntica a la PRL hipofisiaria. Sabharwal y col. (33) demostraron por Western blott que las células mononucleares humanas son capaces de sintetizar y secretar PRL de 60 kDa (Tabla 1). En resumen, múltiples evidencias indican que varias células hematopoyéticas son capaces de producir diferentes tipos de PRL, las cuales pueden ser idénticas a la PRL producida por la pituitaria o con diferentes pesos moleculares pero con similar actividad biológica. En la mayoría de estos estudios, la cantidad de PRL producida por los linfocitos activados es pequeña, por lo que su contribución a la hiperprolactinemia es incierta. Sin embargo, observaciones recientes indican que en los sobrenadantes de cultivos celulares pueden encontrarse hasta 300 pg/ ml de PRL, cantidad suficiente para activar receptores de PRL (34). Por otro lado, pueden encontrarse elevadas concentraciones de PRL en el timo y otros tejidos del sistema inmune, tales como bazo, ganglios linfáticos, amígdalas, lo que indica un papel de regulación paracrino y autocrino de la PRL sobre las células del sistema inmune.

Tabla 1. Producción de prolactina por células del sistema inmune.

Tipo de célula	PRL en modelos experimentales	PRL en humanos
Monocitos	24 y 48 kDa	60 y 23 kDa
Linfocitos T	48 y 24 kDa	11 y 27 kDa
Linfocitos B (Linfoma)	48 y 24 kDa	23 y 25 kDa
Timocitos	35, 33 y 22 kDA	23, 24, 21 y11 kDa
Línea celular Jurkat (Leucemia de linfocitos T)		23 y 25 kDa
Línea celular IM-9-P3-B (Leucemia de células B)		23 kDa
Línea celular YT (Células NK)		23 kDa
Leucemia mieloide y M4		23, 43, y 16 kDa

Mecanismos de inmunoregulación de PRL

En 1989, Hartmann y col. (35) cuando estudiaban el efecto de PRL exógena sobre la proliferación linfocitaria *in vitro* encontraron que la adición de anticuerpos anti-PRL produjo una inhibición profunda de la proliferación celular (90%) en la fase G1 a S. Esta inhibición fue prevenida por la adición de PRL purificada pero no por hormona del crecimiento (GH). Estos resultados indican que los linfocitos humanos necesitan PRL para proliferar in vitro. Posteriores estudios demostraron que la PRL es un factor de crecimiento necesario para complementar la actividad proliferativa iniciada por IL-2 (36). La PRL incrementa la producción de Oxido Nítrico, IL-1 e IFN-γ. La PRL activa la protein kinasa C, induce expresión de receptores de IL-2 (37) y estimula la expresión del Factor 1 regulador de IFN (IRF-1), el cual es un importante regulador de la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B. De este modo la PRL estimula la producción de autoanticuerpos y se asociada con un incremento de linfocitos CD2 (38, 39).

Receptores de PRL y señales de transducción

Los receptores de PRL (R-PRL) son expresados por una gran variedad de células. Rusell et al (40), demostraron por primera vez, la presencia de receptores de PRL en los linfocitos T, B, monocitos y células esplénicas. La clo-

nación de receptores ha permitido entender como es que esta hormona/ citoquina participa en el crecimiento, diferenciación, angiogénesis, protección contra apoptosis e inflamación. Los R-PRL pertenecen a una familia nueva que incluye receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, GH y eritropoyetina (41,42). La interacción de PRL con sus receptores conduce a la activación de una cascada de eventos intracelulares. Los R-PRL utilizan las vías JAK/ Stat las cuales son el prototipo de vías de activación usadas por todos los receptores de citoquinas. De este modo, la PRL unida a los R-PRL forma un complejo activo que conduce a la activación de las protein kinasas JAK2 y Stat5. En este sentido, Yu-Lee ha propuesto que la activación del sistema Jak/ Stat/ IRF-1 conduce a la modulación de la actividad biológica de muchas células y de la respuesta inmune (43).

PRL y modelos experimentales de LES

El lupus murino se caracteriza por alteraciones de autoinmunidad que semejan al LES humano: aberraciones en la producción de citoquinas, linfoproliferación, hipergammaglobulinemia, formación de autoanticuerpos, complejos inmunes, anemia hemolítica, artritis y glomerulonefritis. Un dato interesante es que la cepa de ratones hembras NZB x NZW F1 (B/W) desarrollan una enfermedad de inicio temprano, de mayor severidad y con mortalidad mas temprana que su contraparte cepa de ratones machos. Estos hallazgos sugieren que al igual que en el lupus humano, un componente de diferenciación sexual modula la expresión de lupus murino (44, 45). A partir de 1991, McMurray y col. (46) estudiaron el efecto de la PRL producida por transplante de células de la hipófisis anterior y encontraron que la hiperprolactinemia se asoció a concentraciones elevadas de IgG, anticuerpos anti-DNA, glomerulonefritis por complejos inmunes y mortalidad temprana en este modelo experimental. Cambios similares se observaron en pseudoembarazo de estos ratones (situación experimental que condiciona un estado hiperprolactinémico). Esta respuesta autoinmune acelerada parece ser acentuada por la estimulación estrogénica de la secreción de PRL, independiente del efecto inmunosupresor de los andrógenos El tratamiento con BRC produjo mejoría clínica en todos estos parámetros de actividad del LES murino (47). Estos datos apoyan claramente que la PRL es inmunoestimuladora en enfermedades autoinmunes y que el objetivo terapéutico de disminuir los niveles de PRL puede ser benéfico.

Recientemente, Peeva y col en un modelo de ratones transgénicos, demostraron que el tratamiento con PRL por 4 semanas induce un fenotipo semejante a lupus con incremento de células B secretoras de anti-DNA, títulos elevados de este anticuerpo y glomerulonefritis. Este estudio demuestra que el incremento de PRL rompe la tolerancia de células B en este modelo de ratones (48).

PRL y Lupus Eritematoso Sistémico

El papel de la PRL en la expresión clínica y patogénesis del LES se sustenta en los hallazgos de hiperprolactinemia en el 20 al 40% de pacientes, especialmente en estado de actividad. Sin embargo, este último aspecto ha sido motivo de controversia por mas de una década. La Tabla 2 muestra los diferentes estudios clínicos de PRL y LES. En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que los linfocitos de pacientes con LES activo tiene una producción incrementada de PRL de 11, 24 y 27 kDa (49). Otro estudio demostró que los linfocitos de pacientes con LES, la mayoría activos, secretan una PRL bioactiva de 60 kDa (50). Un estudio reciente ha encontrado una PRL de 130 kDa en pacientes con LES inactivo (51). La PRL induce la síntesis de inmunoglobulinas y anticuerpos anti-DNA cuando se agrega a cultivos celulares de pacientes con LES activo (52). En relación con estos hallazgos, Jacobi y colaboradores (53) encontraron que las concentraciones de 20 ng/ml de PRL son mas eficaces para estimular la síntesis de IgG que la concentración de 100 ng/ml. Un hallazgo interesante en modelos experimentales tempranos muestra que las ratas hipofisectomizadas retienen 50% de la PRL biológicamente activa en la circulación (54). La neutralización de esta PRL residual resulta en muerte por alteración inmune. De esta manera, la PRL extrapituitaria

Tabla 2. Hiperprolactinemia y actividad en pacientes con LES.

Autor (referencia)	Pacientes	%	Controles	%	Actividad clínica
Jara y col (84)	10/45*	22	0/28	0	Si
Buskila y col (85)	10/63	16	ND	—-	No
Neidhart (86)	9/29*	30	0/29	0	Si
Pauzner y col (87)	16/82	20	ND	—-	No
Ostendorf y col (88)	4/182	2	ND	—-	No
Rovensky y col (89)	11/34*	31	0/19	0	No
Jimena y col (90)	10/36*	28	0/20	0	No
Jacobi y col (53)	17/60*	28	0/47	0	Si
Leaños-Miranda (91)	41/259	16	ND	—-	Si
Pacilio y col (92)	21/78	27	ND	—-	Si
Vera Lastra y col (93)	30/43*	69	0/36	0	Si

* PRL en pacientes vs controles, p< 0.001; ND: no dato.

puede ser capaz de compensar la acción de la PRL hipofisiaria. Sin embargo, el papel de la PRL secretada por los linfocitos de pacientes con LES aún no está determinado.

Hiperprolactinemia y órganos afectados por LES

Virtualmente, cualquier órgano, aparato o sistema puede ser afectado por el LES y el mecanismo de daño a los tejidos es múltiple, de tal forma que no puede ser atribuido a una sola causa y puede ser por complejos inmunes, autoanticuerpos, activación del complemento, citoquinas, participación de macrófagos, linfocitos T citotóxicos, etc. La evidencia de la participación directa de las hormonas en una respuesta inflamatoria/ autoinmune es limitada. La PRL tiene actualmente más de 300 funciones fisiológicas y el paso inicial para su acción, al igual que otras hormonas es la unión a receptores de membrana y este R-PRL se ha encontrado en células del sistema inmune, piel, células sinoviales, condrocitos, osteoblastos, riñón, sistema nervioso central, células endoteliales, retina, etc (55-57). Estas células y tejidos son blancos importantes de la actividad del LES.

Uno de los órganos mas frecuentemente afectados en el LES es el riñón. Los mecanismos responsables de la glomerulonefritis lúpica son muy diversos (complejos inmunes, anti-DNA, apoptosis, etc) y conducen a la lesión glomerular crónica, con atrofia y fibrosis tisular. En la década pasada se ha sugerido la participación de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 en el daño renal. Adicionalmente, hemos encontrado evidencias de la participación de la PRL en el desarrollo de la nefritis lúpica. Los pacientes con nefritis lúpica activa y severa tienen concentraciones elevadas de IL-6 y PRL en sangre periférica y en orina (58, 59). Estos resultados apoyan la hipótesis de síntesis local de IL-6 y PRL en el tejido renal o por los linfocitos activos T y B que infiltran el tejido renal. Futuros estudios al respecto deberán llevarse a cabo para confirmar estos hallazgos. Los modelos experimentales mencionados previamente apoyan fuertemente el papel de la PRL en la glomerulonefritis lúpica.

Otro órgano frecuentemente afectado por LES es el sistema nervioso central (SNC). La PRL participa en algunas funciones fisiológicas del SNC (libido y ritmo del sueño) y parece ser útil para el diagnóstico de convulsiones (60). Receptores de PRL se han descrito en el plexo coroideo (lugar donde se forma el líquido cefalorraquídeo: LCR), hipotálamo y otras áreas del SNC (61). Con base en estos hallazgos y a la evidencia de hiperprolactinemia en algunos pacientes con LES y afección del SNC, así como de citoquinas en LCR (62), nosotros determinamos los valores de PRL e IL-6 en el LCR de pacientes con LES y afección del sistema nervioso central (SNC). Estos resultados mostraron que los pacientes con LES-SNC activo presentan elevadas concentraciones de IL-6 y PRL en el LCR y en algunos casos mas elevadas que en el suero, sugiriendo síntesis intratecal de estas sustancias. Encontramos también una relación directa entre las concentraciones de IL-6 y PRL en LCR, pero no en sangre periférica. Estos hallazgos sugieren por primera vez una comunicación inmunoneuroendocrina alterada en pacientes con LES (63). Sin embargo esta relación parece no ser evidente con otras citoquinas o sus receptores. Recientemente se ha investigado la relación entre hiperprolactinemia y receptores solubles de IL-2 en 18 pacientes con LES hiperprolactinémicos, en 18 pacientes normoprolactinémicos y en 10 controles. Los resultados de este estudio muestran ausencia de correlación entre los niveles de PRL y los niveles de receptores solubles de IL-2 (64).

Se han descrito varios casos de hiperprolactinemia (H-PRL) secundaria a microadenomas en pacientes con LES. McMurray y colaboradores, describieron 4 mujeres con H-PRL crónica (prolactinomas en 3 de ellas) que desarrollaron LES. Bergfeld y colaboradores describieron ocho casos mas con LES y prolactinomas. Nosotros informamos 7 mujeres con H-PRL de larga evolución secundaria a microadenoma hipofisiario que desarrollaron LES y en algunos casos el diagnóstico de LES se hizo cuando se había disminuido la dosis de BRC o interrumpido el tratamiento (65-67). La H-PRL secundaria a microadenoma puede ser el factor iniciador de LES en un subgrupo de pacientes sobre todo cuando se interrumpe o disminuye la dosis de la BRC. Existen pacientes con LES en quienes ninguna causa secundaria de hiperprolactinemia es encontrada. En estos pacientes hay que considerar las siguientes posibilidades:

1. Diversas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y la IL-6 pueden estimular la síntesis y liberación de PRL atravesando la barrera hematoencefálica y 2. Puede haber defectos en el control de la secreción de PRL. En este sentido, nosotros hemos encontrado niveles séricos elevados de hystidil-prolinediketopiperazine o ciclo (His-Pro) (CHP), un péptido inhibidor de la liberación de PRL, en pacientes con LES. Este incremento de CHP puede ser un mecanismo compensatorio ante la presencia de PRL probablemente extrahipofisiaria. En otro estudio, se encontró niveles séricos disminuidos de ácido homovanílico, un metabolito de la dopamina. Estos estudios sugieren un defecto en el metabolismo de la dopamina en pacientes con LES semejante al observado en hiperprolactinemia idiopática (68, 69)

LES, PRL e Inmunogenética

Un dato de gran interés es que el gen de la PRL se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos, cerca de la región HLA. Está compuesto de 5 exones y 4 intrones, y tiene una longitud de 10 kb. Estudios de la década pasada demostraron un desequilibrio de ligamiento entre los genes que confieren susceptibilidad para LES y AR, los alelos HLA-DRB1 y los alelos microsatélites cercanos al gen de PRL (70). Otro estudio ha demostrado una frecuencia incrementada del alelo PRL_1149 G (polimorfismo de un solo nucleótido) en los linfocitos de pacientes con LES comparada con controles normales la

cual altera la producción local de PRL (71). Estos datos proporcionan una sólida base molecular para explicar la relación entre PRL y la progresión del LES en humanos (72).

Aspectos terapéuticos

El razonamiento para tratar el LES humano con BRC es el siguiente: 1. La PRL actúa como una citoquina proinflamatoria e inmunoestimuladora; 2. La PRL estimula el lupus experimental; 3. La PRL se asocia con actividad del LES y con órganos afectados en humanos; 4. La BRC restaura la inmunocompetencia, la tolerancia inmune y mejora la sobrevida alterada por PRL en modelos experimentales.

Peeva y col (73) en un modelo experimental de ratones transgénicos que desarrollan glomerulonefritis mediada por E que activan linfocitos B secretores de anti-DNA patogénico, demostraron que el tratamiento con BRC, disminuyó los títulos de anti-DNA y el depósito de IgG en los riñones comparados con los ratones tratados con E únicamente. Estos estudios sugieren que algunos efectos de E sobre las células B autoreactivas son evidentes sólo en presencia de PRL.

La BRC puede suprimir la respuesta inmune a través de dos mecanismos: 1. La supresión de la secreción de PRL por la hipófisis anterior o 2. Por un efecto directo inmunosupresor. Los hallazgos experimentales de Neidhart (74) apoyan la primera posibilidad. En este modelo experimental, la BRC redujo la concentración de PRL y la actividad del lupus. Sin embargo, para inhibir la actividad de los linfocitos fue necesario utilizar dosis de BRC muy superiores a lo que se usa *in vivo*. En relación con la segunda posibilidad, se ha demostrado que la BRC puede producir una inhibición reversible de la activación de linfocitos T y B (75,76).

A principios de los años 90, varios informes anecdóticos sugirieron la posibilidad de que la BRC pudiera ser benéfica en pacientes con LES activo (77). Los ensayos clínicos de BRC en LES se inician con los resultados informados por McMurray (78) y colaboradores quienes trataron 7 pacientes con LES con leve a moderada actividad de la enfermedad. La dosis de BRC utilizada fue de 3.75 a 7.5 mg al dia y los pacientes fueron evaluados en condiciones basales y durante 6 a 9 meses. La actividad de LES fue disminuida significativamente después de 6 meses de tratamiento y los efectos secundarios fueron escasos. Al interrumpirse la BRC, los pacientes fueron seguidos por 5 meses y 5 pacientes se volvieron hiperprolactinémicos y todos los 7 pacientes tenían reactivación del LES y requirieron cambio de medicación.

Posteriormente nosotros realizamos el primer ensayo clínico controlado de BRC en LES (79). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con una dosis fija de BRC (2.5 mg/dia) durante un promedio de 12.5 meses, fue capaz de reducir el número de recaídas/ paciente/ mes en 36 pacientes que recibieron BRC comparado con 30 pacientes del grupo placebo evaluados a intervalos de 30 a 45 días. La hiperprolactinemia fue encontrada en el 51.4% de pacientes del grupo de BRC y en 40% del grupo placebo.

Finalmente, un estudio reciente aleatorizado, compara hidroxicloroquina contra BCR en pacientes con LES activo durante un año. Los datos de los primeros 24 pacientes confirman que tanto la BRC como la hidroxicloroquina son capaces de disminuir las manifestaciones de actividad del LES (80). El advenimiento de nuevas drogas dopaminérgicas con menos efectos secundarios que la BRC ha permitido abrir otras opciones terapéuticas. Una de estas drogas, Quinagolide (Norprolac), ha sido utilizada en un grupo de pacientes con LES con el objeto de determinar el efecto de este medicamento sobre los niveles séricos de citoquinas, PRL y actividad clínica. Después de 6 meses de tratamiento se observó una significativa y directa correlación entre las concentraciones de PRL y de IL-6 y una correlación negativa entre PRL y receptores solubles de factor de necrosis tumoral. Se observó también una significativa disminución de la puntuación de SLEDAI y una débil correlación con PRL. Este estudio sugiere que la Quinagolida puede tener un papel en el tratamiento del LES (81).

Conclusiones

1. Una gran cantidad de evidencias *in vitro*, en modelos experimentales y en humanos, indican que las hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores participan en la respuesta inmune/inflamatoria. Los estrógenos, la progesterona y los andrógenos participan en esta respuesta estimulándola o inhibiéndola. Estas hormonas periféricas actúan en forma coordinada con los ejes de respuesta al estrés.
2. La PRL participa como estimulador de la respuesta inmune celular y humoral y evidencias clínicas y en modelos experimentales indican una clara participación en la patogénesis y en la expresión clínica del LES interactuando con citoquinas, estimulando y amplificando la respuesta inmune/ inflamatoria, participando en la formación de autoanticuerpos y en la ruptura de la tolerancia inmune por mecanismos aún no bien dilucidados. Un metaanálisis reciente determinó el papel de las hormonas en LES y concluye que la liberación anormal de PRL en pacientes con LES apoya el compromiso de la hipófisis anterior en la patogenia del LES (82, 83). De esta manera la PRL participa en diferentes procesos inflamatorios/ inmunes locales y sistémicos formando un puente entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino en LES.
3. La terapia hormonal y anti-hormonal puede ser de beneficio en pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes.

Referencias

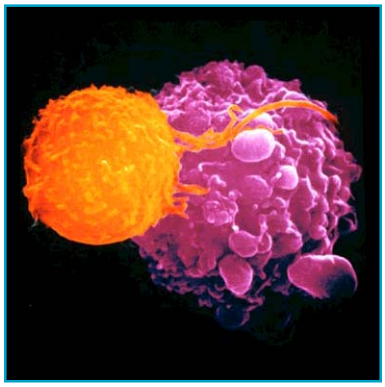
1. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. Anat Rec 1930; 47: 119-29
2. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Poley HF. Effects of cortisone acetate and primary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. Arch Intern Med 1950; 85: 545-66
3. Jafarian-Tehrani M, Sternberg EM. Neuroendocrine-immune modulation of autoimmune/inflammatory diseases. Front Horm Res 2002; 29: 69-82
4. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuroendocrine interactions. Facts and hypothesis. Endocr Rev 1996; 17: 64-102
5. McMurray RW. Sex hormones in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Front Biosc 2001; 6: 193-206
6. Walker SE, Jacobson JD. Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases. Rheum Dis Clin North Am 2000; 26: 713-36
7. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. Annu Rev Immunol 2002; 20: 125-63
8. Imrich R. The role of neuroendocrine system in the pathogenesis of rheumatic diseases (minireview). Endocrine Regulations 2002; 36: 95-106
9. Chikanza IC, Grossman AB. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. Rheum Dis Clin North Am 2000; 26: 693-712
10. McCann SM, Lyson K, Karanth S, et al. Role of cytokines in the endocrine system. Ann NY Acad Sci 1994; 741: 50-63
11. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation 1995; 2: 241-48
12. Masi AT. Neuroendocrine immune mechanisms in rheumatic diseases. An overview and future implications. Rheum Dis Clin North Am 2000; 26: 1003-18
13. Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. The stress response and regulation of inflammatory disease. Ann Intern Med 1992; 117: 854-66
14. Wilder R. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. Ann Rev Immunol 1995; 13: 307-38
15. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. N Engl J Med 1993; 329: 1246-53
16. Gutierez MA, Anaya JM, Cabrera GE, Vindrola O, Espinoza LR. Prolactin, a link between the neuroendocrine and immune systems. Role in the pathogenesis of rheumatic diseases. Rev Rhum Ed Fr 1994; 61: 278-85
17. Chrousus GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. Ann Intern Med 1998; 129: 229-40
18. Sternberg EM, Young WS III, Bernardini R, et al. A central nervous system defect in corticotropin releasing hormone biosynthesis is associated with susceptibility to streptococcal cell wall arthritis in Lewis rats. PNAS 1989; 86: 4771-75
19. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. Endocrine Rev 1996; 17: 369-84
20. Polan ML, Daniele A, Kuo A. Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity. Fertil Steril 1988; 49: 964-8
21. McMurray RW, Ndebele K, Hardy KJ, Jenkins JK. 17-beta-estradiol suppresses Il-2. Cytokine 2001; 14: 324-33
22. Formby B. Immunological response in pregnancy. Endo Met Clin NA 1995; 24: 187-205
23. Shim GJ, Levente Kis L, Warner M, Gustafsson JA. Autoimmune glomerulonephritis with spontaneous formation of splenic germinal centers in mice lacking the *estrogen receptor alpha* gene. PNAS. 2004; 101: 1720-4
24. Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17β-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocytes-derived macrophages. Arthritis Rheum 2004; 50: 1967-75
25. Kanda NT, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1703-11
26. Masi A. Hormonal and immunologic risk factors for the development of the rheumatoid arthritis: an integrative physiopathogenic perspective. Rheum Dis Clin NA 2000; 26: 775-803
27. Lahita R. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin NA. 2000; 26: 951-68
28. Berczi I, Nagy E. The effect of prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function. En: Berczi, Kovacs K (eds): Hormones and Immunity. Lancaster MTP Press 1987, pp 145-71
29. Neidhart M, Larson DF. Freund´s complete adjuvant induces ornithine decarboxylase activity in the central nervous system of male rats and triggers the release of pituitary hormones. J Neuroimmunol 1990; 26: 97-105
30. Yu-lee L. Prolactin stimulates transcription of growth-related genes in Nb2 T lymphoma cells. Mol Cell Endocrin 1990; 68: 21-28
31. Hiestand PC, Mekler P, Nordann R, et al. Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action of cyclosporine. PNAS 1986; 83: 2599-603
32. Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Sukoski CF. Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. Endocrinology 1992; 131: 3019-26
33. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. PNAS 1992; 89: 7713-16
34. Montgomery DW. Prolactin production by immune cells. Lupus 2001; 10: 665-75
35. Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. FASEB J 1989; 3: 2194-202
36. Gushchin GV, Cheney C, Glaser R, Malarkey W. Temporal relationships and IL-2 dependency of prolactin-induced lymphocyte proliferation. J Neuroimmunol 1995; 60. 93-8
37. Mukherjee P, Mastro A, Hymer WC. Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. Endocrinology 1990, 126: 88-94
38. Kumar A, Singh SM, Sodhi A. Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production murine peritoneal macrophages: role of Ca2+ and protein kinase C. Int J Immunopharmacol 1997; 19: 129-33
39. Yu-Lee LY, Luo G, Moutoussamy S, Finidory J. Prolactin and growth hormone signal transduction in lymphohemopoietic cells. Cell Mol Life Sci 1998; 54: 1067-75
40. Russell DH, Kibler R, Matrisian L, et al. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. J Immunol 1985; 134: 3027-31
41. Bole-Feysot C, Goffin V,Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptors: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrin Rev 1998; 19: 225-68
42. Clevenger CV, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction. Lupus 2001; 10: 706-18
43. Yu-Lee L-Y. Stimulation of interferon regulatory factor-1 by prolactin. Lupus 2001; 10: 691-699
44. Theofilopoulos AN. Murine models of lupus. En: Lahita RG(ed). Systemic Lupus Erythematosus, 2nd edn.Churchill Livingstone: New York, 1992, pp 121-94
45. Roubinian JN, Talal N, Siiteri JA, Sadakian JA. Sex hormone modulation of autoimmunity in NZB/NZW mice. Arthritis Rheum 1979; 22: 1162-69
46. McMurray R, Keisler D, Kanuckel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. J Immunol 1991; 147: 3780-87
47. McMurray RW. Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. Lupus 2001; 10: 742-47
48. Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. J Clin Invest 2003; 111: 275-83
49. Gutiérrez MA, Molina JF, Jara LJ, et al. Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) active. Lupus 1995; 4: 348-52
50. Larrea F, Martínez-Castillo A, CabreraV, et al. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 3664-9
51. Cruz J, Aviña-Zubieta A, Martinez de la Escalera G, Clapp C, Lavalle C. Molecular heterogeneity of prolactin in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. Artritis Rheum 2001; 44: 1331-5
52. Gutierrez MA, Molina JF, Jara LJ, et al. Prolactin-induced immunoglobulin and autoantibody production by peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and normal individuals. Int Arch Allergy Immunol 1996; 109: 229-235
53. Jacobi AM, Rohde W, Volk HD, Dorner T, Burmester GR, Hiepe F. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. Ann Rheum Dis 2001; 60: 242-47
54. Nagy E, Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. Endocrinology 1991; 128: 2776-84
55. Jara LJ, Lavalle C, Fraga A, et al. Prolactin, immunoregulation and autoimmune diseases. Semin Arthritis Rheum 1991; 20: 273-84
56. Kelly P, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin /growth hormone receptor family. Endocrin Rev 1991; 12: 235-51
57. Clapp C, Weiner R. Specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kDa fragment of prolactin on capillary endothelial cells. Endocrinology 1992; 130: 896-900

58. Miranda JM, Prieto RE, Paniagua R, et al. Clinical significance of serum and urine prolactin levels in glomerulonephritis. Lupus 1998; 7: 387-91
59. Miranda JM, Paniagua R, García G, et al. Prolactin (PRL) and interleukin-6 (IL-6) in severe lupus glomerulonephritis (GN). Arthritis Rheum 1997; 40 (Suppl 9): S106
60. Fisher RS, Chan DW, Bare M, Lesser RR. Capillary prolactin measurement for diagnosis of seizures. Ann Neurol 1991; 29: 187-90
61. Nyberg F, Isacson CA, Brosted E, Roos P. Characterization of prolactin immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. Brain Res 1990; 506: 129-32
62. Alcocer-Varela J, Alemán-Hoey D, Alarcón-Segovia D. Interleukin-1 and interleukin-6 activities are increased in the cerebrospinal fluid of patients with CNS lupus erythematosus and correlate with local late T-cell activation markers. Lupus 1992; 1: 111-7
63. Jara LJ, Irigoyen L, Ortiz M de J, Zazueta B, Bravo G, Espinoza LR. Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Clin Rheum 1998; 17: 110-4
64. Daza L, Lavalle C, Duarte C, Huerta R, Moreno J. Lack of association between hyperprolactinemia and soluble IL-2 receptor levels in systemic lupus erythematosus patients. Lupus 2003; 12: 107-11
65. McMurray RW, Allen SH, Braun AL, et al. Longstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: possible hormonal stimulation of autoimmune disease. J Rheumatol 1994; 21: 843-50
66. Bergfeld MA, Komatireddy G, Walker SE. Hyperprolactinemic systemic lupus erythematosus (SLE): 8 additional cases with prolactinomas. Lupus 1998; 7 (Suppl 1): 25 (abstract).
67. Alcalá M, Barile L, Miranda JM, Velazquez F, Fuentes M, Jara LJ. ¿Does hyperprolactinemia secondary to microadenoma induce autoimmune diseases?. Arthritis Rheum 1997; 40 (Suppl 9): S267 (abstract 1417).
68. Jara LJ, Prasad C, Espinoza LR. Elevated serum levels of ciclo (His-Pro), an endogenous inhibitor of pituitary prolactin secretion, in systemic lupus erythematosus patients. Lupus 1997; 6: 258-60
69. Ferreira C, Paes M, Gouviea A, Ferreira E, Pádua F, Fiúza T. Plasma homovanillic acid and prolactin in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998; 7: 392-7
70. Brennan P, Hajeer H, Ong KR, et al. Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1383-6
71. Stevens A, Ray DW, Worthington J, Davis JR. Polymorphisms of the human prolactin gene-implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. Lupus 2001; 10: 676-83
72. Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. Autoimmunity Rev 2002; 1: 360-4
73. Peeva E, Grimaldi C, Spatz L, Diamond B. Bromocriptine restores tolerance in estrogen-treated mice. J Clin Invest 2000; 106: 1373-9
74. Neidhart M. Bromocriptine has little direct effect on murine lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion. Biomed Pharmacother 1997; 51: 118-25
75. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunosuppressive property of bromocriptine on human B lymphocytes function in vitro. Clin Exp Immunol 1993; 93: 200-5
76. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. Clin Exp Immunol 1994; 95: 514-8
77. Rabinovich CE, Schanberg LE, Kredich DW. Intravenous immunoglobulin and bromocriptine in the treatment of refractory neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1990; 33 (Suppl): R22 (abstract 49S).
78. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker SE. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1995; 22: 2084-91
79. Alvarez-Nemegyei J, Cobarrubias- Cobos A, Escalante-Triay F, Sosa-Muñoz J, Miranda JM, Jara LJ. Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a double –blind, randomized, placebo-controlled study. Lupus 1998; 7: 414-9
80. Walker SE, Reddy GH, Miller D, et al. Treatment of active systemic lupus erythematosus (SLE) with the prolactin (PRL) lowering drug, bromocriptine (BC): comparison with hydroxycloroquine (HC) in a randomized, blinded one-year study. Arthritis Rheum 1999; 42: S282 (abstract 1267).
81. Hrycek A, Cieslik P, Tustanowski J, Nowak S, Jedynak P. Selected serum cytokines in systemic lupus erythematosus treated with quinagolide. Lupus 2001; 10: 424-30
82. McMurray R, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2003; 48: 2100-10
83. Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, Alcala M, Alvarez-Nemegyei. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. Lupus 2001; 10: 748-56
84. Jara LJ, Gómez- Sánchez C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Vasey FB, Espinosa LR. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. Am J Med Sci 1992; 303: 222-6
85. Buskila D, Lorber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1996; 23: 629-32
86. Neidhart M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. J Rheumatol 1996; 23: 476-81
87. Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Gough JM. Prolactin in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1994; 21: 2064-7
88. Ostendorf B, Fischer R, Santen R, Schmitz-Linneweber B, Specker C, Schneider M. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus? Scand J Rheumtol 1996; 25: 97-102
89. Rovensky J, Jurankova E, Rauova L, et al. Relationship between endocrine, immune, and clinical variables in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1997; 24: 2330-4
90. Jimena P, Aguirre MA, Lopez-Curbelo A, de Andres M, Garcia-Courtay C, Cuadrado MJ. Prolactin levels in patients with systemic lupus erythematosus: a case controlled study. Lupus 1998; 7:383-6
91. Leaños-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Detection of macroprolactinemia with the polyethylene glycol precipitation test in systemic lupus erythematosus patients with hyperprolactinemia. Lupus 2001; 10:340-5
92. Pacilio M, Migliaresi S, Meli R, Ambrosone L, Bigliardo B, Di Carlo R. Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus—association with disease activity. J Rheumatol 2001; 28: 2216-21
93. Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, et al. Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment. J Rheumatol. 2003; 30:2140-6

15

APOPTOSIS

Edgar Garavito



Contenido

Apoptosis y tolerancia inmunológica
Epítopes dominantes y epítopes crípticos
Apoptosis y generación de señales coestimuladoras
Eliminación de células apoptóticas

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, utilizada por el organismo para controlar el tamaño de los órganos y tejidos, así como para depurar células que ya han cumplido su labor. Es mediada por una serie de enzimas tipo proteasas de serina, llamadas caspasas. Existen 10 miembros de esta familia de proteínas con funciones y afinidad por sustratos diferentes. En enfermedades autoinmunes se ha demostrado el papel dual de la apoptosis, ya sea por una tasa exagerada de apoptosis o una falla en la activación de la misma. Este capítulo discutirá acerca de los mecanismos básicos funcionales de la apoptosis y su implicaciones en algunas enfermedades autoinmunes.

La apoptosis, una forma de muerte celular programada, es utilizada por el organismo para controlar de manera fisiológica el número de células de un tejido u órgano, para depurar células que ya han cumplido su labor o para, en condiciones patológicas, eliminar células sometidas a diferentes tipos de estrés (1) (Figura 1). Clásicamente se ha descrito que la apoptosis, a diferencia de la necrosis, es un proceso controlado completamente por la célula sin exponer material intracelular al espacio extracelular, y por tanto, no desencadena una reacción inflamatoria (2). Sin embargo, no existe una única forma de apoptosis, ni de necrosis, por el contrario hay un espectro de muerte celular que va desde la muerte celular estrictamente fisiológica, como la que ocurre durante la embriogénesis, hasta la muerte celular completamente patológica, como la que ocurre durante la isquemia o después del estrés físico (Figura 1). Existen, así mismo, formas de apoptosis y necrosis que se aproximan tanto, que resulta difícil definir cuál es el mecanismo operante. Así, algunas formas de apoptosis pueden desencadenar procesos inflamatorios, y algunas formas de necrosis pueden ocurrir de una manera silente (1). Por último, bajo ciertos niveles de estrés una célula lesionada por estímulos que generalmente desencadenan necrosis, puede rehacer su programa de muerte e iniciar una muerte celular apoptótica, y viceversa, lo cual significa que los dos procesos pueden estar relacionados y operar en una misma célula.

La apoptosis es mediada por una serie de proteasas de cisteína, específicas para ácido aspártico, denominadas caspasas. Existen cerca de 10 miembros de esta familia (Tabla 1), los cuales cumplen diferentes funciones y clivan sustratos distintos (1,4). Las caspasas pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con sus diferencias estructurales y funcionales (4); caspasas iniciadoras son aquellas que presentan dominios de autoactivación y dominios para proteínas adaptadoras que las relacionan con receptores celulares vinculados con la recepción de señales apoptóticas (receptores de muerte), y tienen como blanco al otro grupo de caspasas, las ejecutoras (4). Estas últimas responden por el clivaje de diferentes blancos celulares responsables del fenotipo apoptótico de la célula, como lo son proteínas estructurales, regulatorias y proapoptóticas, así como el mismo DNA (Tabla 2).

Tabla 1. Caspasas.

Nombre actual	Nombre original
Caspasa 1	ICE
Caspasa 2	ICH-1
Caspasa 3	CPP32, Yama, Apopaina
Caspasa 4	ICH-2, TX, ICE
Caspasa 5	ICE, TY
Caspasa 6	Mch2
Caspasa 7	Mch3, ICE-Lap3, CMH-1
Caspasa 8	FLICE, MACH, Mch5
Caspasa 9	ICE, LAP6, Mch6
Caspasa 10	Mch4

Tabla 2. Sustratos de las caspasas.

Involucrados en la reparación celular
· Poli-ADP ribosa polimerasa
· Proteína quinasa dependiente de DNA
· MDM2
Involucrados en el control del ciclo celular
· Retinoblastoma
· Quinasas dependientes de ciclinas
· Oncogen c-abl
Involucrados en la traducción de señales
· PAK
Involucrados en la integridad estructural de la célula
· Laminas
· Fodrina
· Gelsolina
· Actina

APOPTOSIS
Condiciones Fisiológicas
• Muerte celular programada durante la embriogénesis
• Involución dependiente de hormonas en adulto
• Deleción de células proliferantes
• Muerte de células que han culminado su trabajo
• Eliminacipon de células potencialmente peligrosas
• Destrucción de células infectadas
Condiciones Patológicas
• Muerte celular inducida por estímulos lesivos
• Daño celular en celúlas infectadas
• Atrofia en órganos después de obstrucción ductal
• Muerte de células tumorales
• Iniciada por estímulos que inducen necrosis

Figura 1.
Principales diferencias entre apoptosis fisiológica y patológica.

La fase de iniciación de la apoptosis se define como el conjunto de eventos que inician con la recepción de la señal apoptótica y terminan con la activación de las caspasas ejecutoras. La fase efectora inicia con la activación de las caspasas ejecutoras y termina con la fagocitosis de la célula muerta o de fragmentos celulares revestidos con membrana (cuerpos apoptóticos) (1).

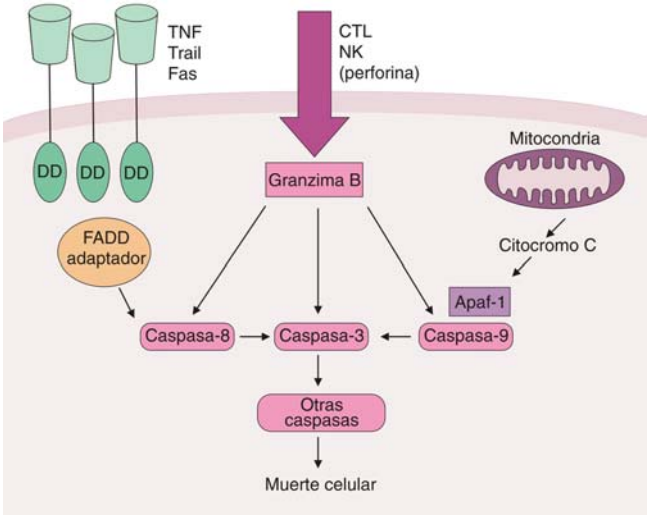


FIGURA 2.
Iniciación de apoptosis por vía extrínseca e intrínseca.

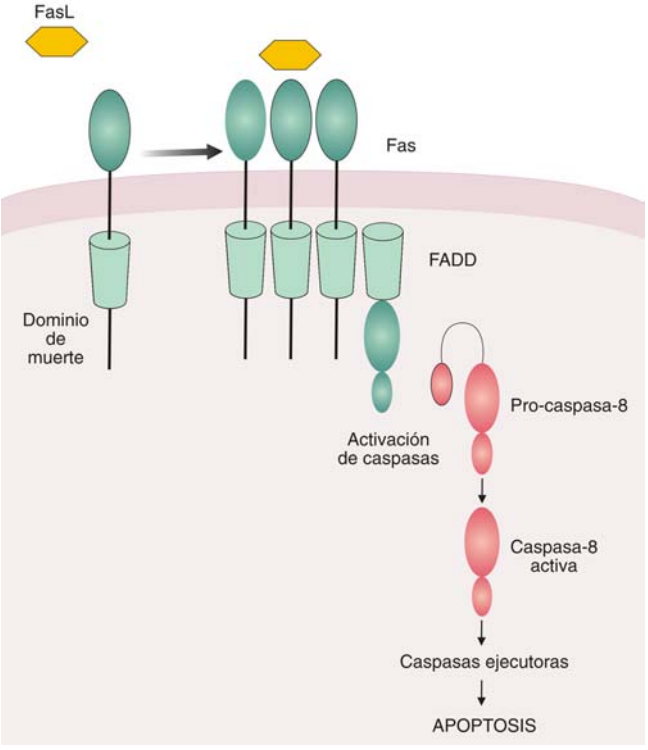


FIGURA 3.
Activación de la caspasa 8 por intermedio de Fas, para desencadenar apoptosis.

TABLA 3. Miembros de la familia del Bcl-2.

Proteínas Anti-apoptóticas	Proteínas Pro-apoptóticas	Proteínas con Homología BH3
Bcl-2	Bax	Bad
Bcl-x	Bak	Bid
Bcl-w	Bcl-xs	Bik
Mcl-1		HrK
NR-13		Noxa
A-1		PUMA

La iniciación de la apoptosis puede ser mediada por señales externas a la célula, vía extrínseca, o por señales originales en la misma célula, vía intrínseca (Figura 2). Ambas vías confluyen en la activación de caspasas iniciadoras como las caspasas 8, 9 y 10 que clivan caspasas ejecutoras, (3, 6 y 7), que finalmente clivan sustratos importantes para mantener la estructura y la vitalidad celular (5). Los principales ejemplos de señales proapoptóticas externas corresponden a miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF-α, FasL) (Figura 3), cuyos receptores celulares presentan dominios de muerte capaces de reclutar proteínas adaptadoras que finalmente activan a las caspasas iniciadoras (6). Otro ejemplo de señales extrínsecas son las proteínas líticas, perforinas y granzimas, secretadas por los linfocitos citolíticos (linfocitos T CD8+ y células asesinas naturales) que entran a la célula y directamente reclutan a las caspasas iniciadoras y ejecutoras (7,8) (Figura 2). La vía intrínseca es iniciada por un disbalance entre los diferentes miembros de la familia de proteínas emparentadas con bcl-2 (Tabla 3), unos con actividad proapoptótica y los otros con actividad antiapoptótica (9). Este disbalance responde por la salida de citocromo C desde el espacio intermembranoso de la mitocondria al citosol donde se une a proteínas adaptadoras que agrupan, y de esta manera activan, a las caspasas iniciadoras (Figura 4).

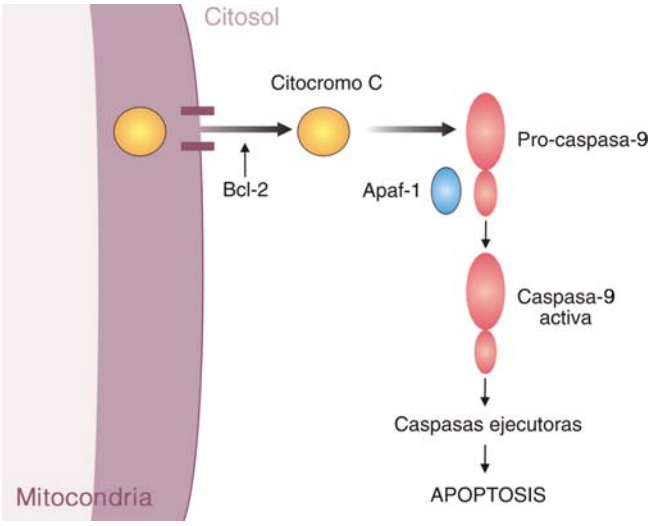


FIGURA 4.
Activación de la apoptosis en la vía mitocondrial dependiente de la liberación del citocromo C.

Los principales cambios fenotípicos en células apoptóticas ocurren en el núcleo y en la membrana celular. En el núcleo, la envoltura celular es degradada, el DNA es fragmentado y la cromatina es empaquetada, junto con restos citosólicos, en partículas revestidas por membranas, denominados cuerpos apoptóticos (1). La membrana celular se plega formando estructuras vesiculares que brotan de la superficie celular y expone gran cantidad de moléculas que originalmente no se encuentran en ella o que normalmente son expuestas a la cara citosólica de ésta, son translocadas y expuestas al medio extracelular (10) (Tabla 4). Los macrófagos y las células dendríticas expresan gran diversidad de receptores para estas moléculas de membrana (Tabla 4), reconocen éstas y fagocitan a las células apoptóticas en sus diferentes fases, como células completas o como cuerpos apoptóticos (Figura 5) (11).

Apoptosis y tolerancia inmunológica

La evolución los linfocitos T y B ha desarrollado un mecanismo de diversidad genética, mediante el cual estas células generan un extenso repertorio de receptores para antígenos, que supera en varios órdenes de magnitud al número potencial de antígenos presentes en nuestro organismo (autoantígenos), en otros individuos de la especie (aloantígenos), y en otras especies (xenoantígenos) (12, 13). Así, nuestro organismo genera un repertorio inicial de linfocitos con el potencial de reconocer la mayoría de los antígenos presentes en la naturaleza. Sin embargo, los linfocitos T y B no discriminan entre antígenos propios (autoantígenos) y antígenos extraños y todo individuo

Tabla 4. Receptores y ligandos involucrados en el reconocimiento de células apoptóticas.

Receptor (fagocito)	Ligando y adaptador (célula apoptótica)
β2-GPI receptor	PS, β2-GPI
Integrinas	
CR3, CR4 iC3b	
αvβ3 / CD36	PS, Tsp
Receptores para colectinas	C1q, C3, C4, MBL, SP-A, SP-D
Receptores barrenderos (scavenger)	
CD36	PS, oxLDL
SR-A	PS, oxPL
CD68	PS, oxLDL
LOX-1	PS
SR-B1	PS
CD21 / CD35	Complemento
ABC1	PS
CD14	PS, ICAM-3
CD31-R (PECAM-1-R)	CD31 (PECAM-1)
Lectinas	Carbohidratos
FcγR	IgG, CRP, SAP, PTX3, HRG; Anti-S, anti-M, anti-L, oxPL, CRP
c-mer	Gas-6
CD91 /calreticulina	Calreticulina, colectinas, Proteínas de choque térmico
Gas-6	PS
PSR	PS

GPI: glicosilfosfatidilinositol; HRG: glicoproteína rica en histidina; ICAM: Molécula de adhesión intercelular; MBL: Lectina de unión a manosa; oxLDL: LDL oxidada; oxPL: fosfolípido oxidado; PECAM: Molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio; TSP: trombospondina; PS: fosfatidil serina; PSR, Receptor de fosfatil serina; SP-A: Proteína A del surfactante; SP-D: proteína D del surfactante; FcγR: Receptor para IgG.

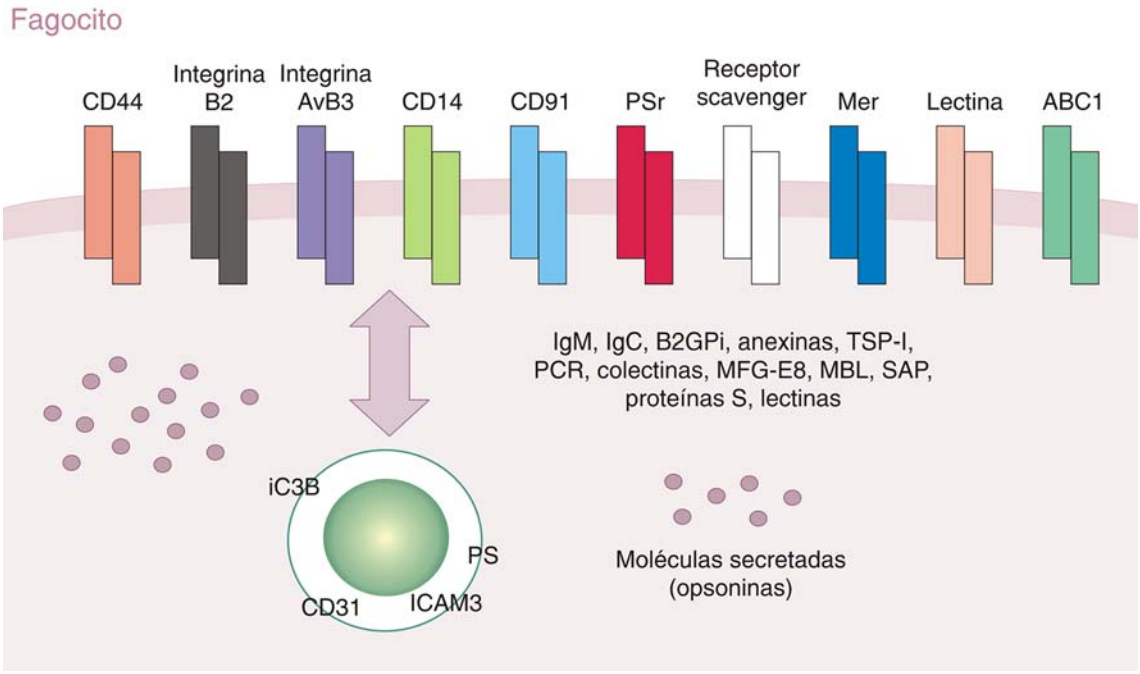


Figura 5.
Ligandos y receptores vinculados con la fagocitosis de células apoptóticas.

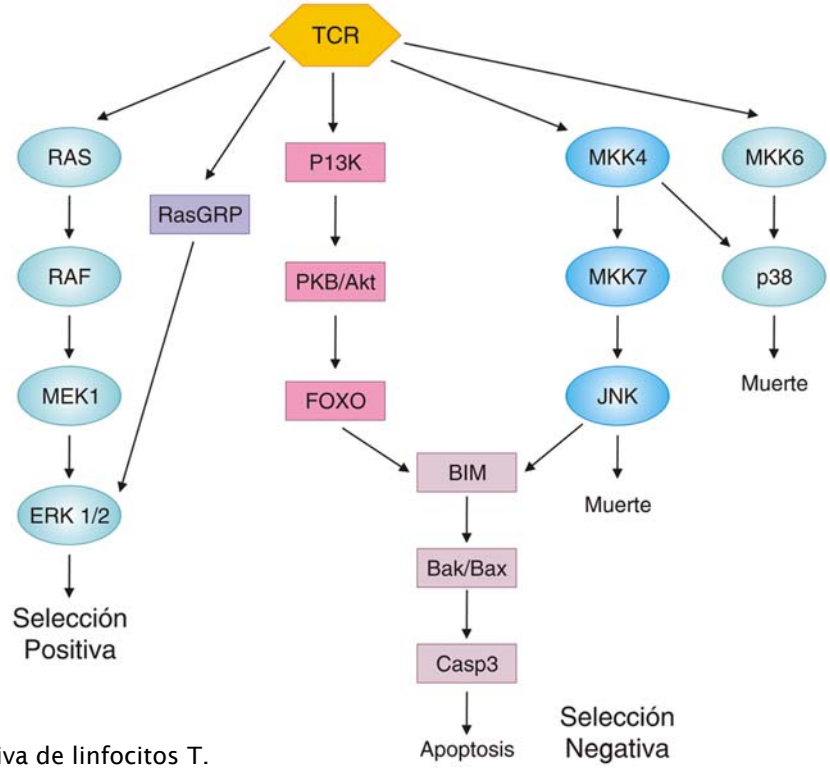


FIGURA 6.
Selección positiva y negativa de linfocitos T.

expresa un riesgo potencial de sufrir autoinmunidad (14). Para evitar esta última, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos celulares y moleculares que en su conjunto son denominados tolerancia inmunológica (15). Ésta es llevada a cabo en distintos sitios para las dos poblaciones de linfocitos. En los órganos linfoides primarios para los linfocitos inmaduros (tolerancia central) y en los órganos linfoides secundarios y tejidos periféricos no linfoides para los linfocitos maduros (tolerancia periférica). La tolerancia central para los linfocitos B ocurre en la medula ósea y es debida a la deleción (por apoptosis) de linfocitos B inmaduros que expresan receptores de alta afinidad para antígenos de membrana, presentes en altas concentraciones en el microambiente hematopoyético de la medula (16). Sin embargo, esta deleción no es muy significativa por lo cual, en condiciones normales, gran número de células B autorreactivas maduran en la medula ósea y circulan por los órganos linfoides secundarios produciendo autoanticuerpos de baja afinidad, una vez son expuestas a sus respectivos autoantígenos. La producción de estos autoanticuerpos naturales colabora con la remoción de detritos tisulares que resultan del recambio normal de los tejidos y no representan peligro alguno para el organismo, pues no desencadenan fenómenos inflamatorios. Por otro lado la actividad de los linfocitos B está regulada por los linfocitos T ayudadores (CD4+) (17), los cuales una vez activados, producen una serie de citoquinas que estimulan o inhiben la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Así, los linfocitos B autorreactivos son dependientes de los linfocitos T autorreactivos y la tolerancia de los linfocitos T tiene más relevancia que su homóloga en los linfocitos B.

Durante su paso por el timo los precursores de los linfocitos T, linfocitos T inmaduros o simplemente timocitos, son sometidos a un proceso de selección que busca dos objetivos. El primero producir un repertorio suficiente de linfocitos T capaces de enfrentar el desafío antigénico externo y de montar una respuesta inmune apropiada contra los diferentes microorganismos y en segundo lugar, disminuir de manera significativa el número de linfocitos T potencialmente autorreactivos generados en el timo (18). Para el primer fin, los linfocitos T son sometidos a una selección positiva que busca rescatar aquellos timocitos que producen y expresan un receptor capaz de reconocer las diferentes moléculas HLA expresadas por las células epiteliales (CE) del timo (19). Este reconocimiento es indispensable para la posterior activación de los linfocitos T maduros, una vez éstos contactan antígenos acoplados a dichas moléculas de histocompatibilidad en la superficie de las células presentadoras de antígenos (20). Para el segundo fin, los timocitos son sometidos a una selección negativa mediante la cual aquellos linfocitos autorreactivos, que reconocen con alta afinidad autoantígenos acoplados a moléculas HLA en la superficie de las células epiteliales del timo, son inducidos a una muerte celular programada (21,22). De esta manera se eliminan células autorreactivas y se genera un mecanismo de tolerancia, sin disminuir de manera importante el repertorio de linfocitos T capaz de mantener una inmunidad eficiente contra los diferentes microorganismos. La selección negativa es ejecutada a través de un mecanismo apoptótico convencional en el cual participan diferentes caspasas ejecutoras activadas por señales extrínsecas e intrínsecas (Figura 6) (23,24). La selección tímica responde por la

deleción de un número importante de linfocitos T autorreactivos, sin embargo muchos linfocitos T escapan de la selección negativa y salen a los órganos linfoides secundario como células T autorreactivas (15,18). Muchas de estas células circulan por los órganos linfoides, no van a los tejidos periféricos y usualmente no se encuentran con los autoantígenos respectivos, ya que muchos de éstos no son llevados a dichos órganos linfoides (25). No obstante, para evitar que los linfocitos T autorreactivos se activen en la eventualidad de un encuentro con dichos autoantígenos, un mecanismo de tolerancia periférica opera inactivando las células estimuladas (anergia por ausencia de segunda señal) (26,27), suprimiéndolas por linfocitos T reguladores T (CD4+ CD25+)(28,29) o incluso llevándolas a la muerte mediada por su activación, un mecanismo denominado muerte celular inducida por la activación (AICD) (30) que utiliza la clásica vía extrínseca de la apoptosis, mediada por los receptores asociados a dominios de muerte como el Fas.

Epítopes dominantes y epítopes crípticos

Para estimular un linfocito se requieren al menos dos señales. Una de ellas es mediada por la interacción entre el receptor antigénico de la célula T y un complejo bimolecular formado por la asociación de una molécula de histocompatibilidad (HLA) con un péptido (epítope) derivado de una proteína (Figura 6). Dicha proteína ha de ser fagocitada, si es del medio extracelular, y procesada (clivada) en pequeños péptidos los cuales son acoplados con moléculas HLA, y expresados junto con éstas en la membrana de las células presentadoras de antígenos (31). El procesamiento de las diferentes proteínas celulares es llevado a cabo por diferentes enzimas relacionadas con la vías apoptóticas (caspasas, granzimas y otras proteasas) o independientes de éstas (proteosomas y enzimas lisosomales) (31). Existen unas vías convencionales de clivaje las cuales son expresadas por muchas de las células del organismo que generan un repertorio de péptidos convencionales llamados epítopes dominantes (32). Estos péptidos son generados cada vez que una célula presentadora de antígenos procesa y presenta proteínas o cada vez que una célula activa su maquinaria de apoptosis. Por otro lado existen vías alternas, no usuales, de procesamiento que generan péptidos no convencionales, epítopes crípticos, que no son producidos por los mecanismos de procesamiento convencionales y por tanto no participan de la selección negativa en el timo y para las cuales existen linfocitos T autorreactivos capaces de reconocerlos y montar una respuesta inmunitaria (31,33). Estos epítopes crípticos se producen bien sea porque la proteína natural sufre modificaciones estructurales previas a su procesamiento que hacen que las enzimas convencionales generen nuevos epítopes a partir de ellas, o cuando estas proteínas son procesadas por enzimas diferentes a las convencionales que clivan la misma proteína en diferentes puntos (34). Ejemplos de modificaciones postraduccionales de proteínas asociados con la producción de epítopes crípticos son la fosforilación/defosforilación, la adición de grupos isoaspartilo, la transglutaminación y la deiminación (citrulinación) (Tabla 5) (34). Un buen ejemplo de procesamiento no convencional ocurre cuando los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales son activados (7). Durante la respuesta inmunitaria innata y adaptativa contra las infecciones virales, las células asesinas naturales y los linfocitos T citotóxicos son involucrados, respectivamente. Estas células, una vez activadas, secretan una serie de perforinas, que se polimerizan en la membrana de la célula blanco produciendo poros y unas enzimas, granzimas, que penetran por estos poros al citoplasma e inician la activación directa e indirecta de las caspasas (8). De particular importancia resulta la actividad de la granzima B, esta enzima una vez en el citoplasma cliva y activa caspasas iniciadoras y efectoras, así como activa la proteína Bid, un miembro proapoptótico de la familia de la bcl-2 (Tabla 3) (34). La granzima B también afecta sustratos relacionados con muerte celular e independientes de las caspasas, como lo es la nucleasa apoptótica DFF45/ICAD (Factor 45 de fragmentación del DNA) (34,35). Muchos autoantígenos vinculados al amplio espectro de enfermedades autoinmunes humanas son clivados directa y eficiente-

Tabla 5. Modificaciones postraduccionales en proteínas asociadas con enfermedades autoinmunes.

Modificación	Enfermedad	Antígeno
Fosforilación	EAE, EM y LES	Múltiples antígenos
Glicosilación	AIC	Colágeno II
Deiminación	AR y EAE	Fibrina y MBP respectivamente
Acetilación	EAE	MBP
Hidroxilación	AIC	Colágeno II
sDMA	LES	SmD1 y smD3
Deamidación	EC	Gliadina
Peroxidación	Ateroesclerosis	LDL y otros
Generación de isoAsp	LES	snRNPs

EAE: encefalitis autoinmune experimental; EM: esclerosis múltiple; LES: lupus eritematoso sistémico; AIC: artritis inducida por colágeno; AR: artritis reumatoide; MBP: proteína básica de la mielina; sDMA: dimetil arginina simétrica; EC: enfermedad celíaca; LDL: lipoproteínas de baja densidad; isoAsp: isoaspartilos; snRNP: ribonucleoproteínas pequeñas nucleares

Tabla 6. Autoantígenos clivados por la Granzima B.

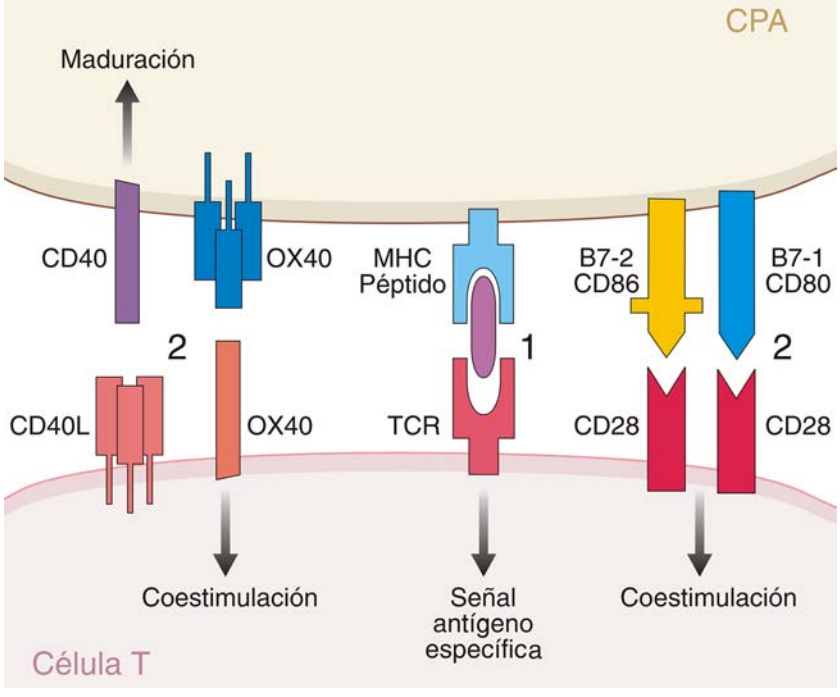
- DNA-PK
- Numa
- La
- Fibrilarina
- U1-70kD
- Isoleucil tRNA sintetasa
- Alanil tRNA sintetasa
- Ki-67
- CENP-B
- SRP-72
- NOR-90
- Topoisomerasa 1
- Mi-2
- PMS1
- PARP
- PMS2
- Histidil tRNA sintetasa
- RNA polimerasa I
- PMScL
- RNA polimerasa II
- KU-70

mente por la granzima B, generando fragmentos peptídicos (epítopes) muy diferentes a aquellos producidos por la acción de las caspasas sobre los mismos antígenos (Tabla 6) (36). La susceptibilidad al clivaje por granzima B hace a un antígeno altamente sugestivo de ser autoantígeno (36). Así, muchos antígenos que no están relacionados como autoantígenos, no son susceptibles al clivaje selectivo mediado por granzima B (36). Un hecho muy interesante es la ausencia de eventos líticos asociados a enzimas derivadas de gránulos citolíticos (granzimas y perforinas) en el timo (37), lo cual resulta en la ausencia de tolerancia central hacia los epítopes crípticos generados, en los tejidos extratímicos, por vía de la granzima B durante la respuesta inmunitaria contra células infectadas por virus o por bacterias intracelulares.

Apoptosis y generación de señales coestimuladoras.

Como se menciono antes, la activación de un linfocito T requiere de al menos dos señales (Figura 7), una de ellas, la principal o señal 1, es mediada por la interacción del receptor de la célula T con el complejo HLA-péptido antigénico. Esta señal es altamente específica pues muy pocos linfocitos T tienen el receptor apropiado para cada complejo HLA-péptido. Sin embargo, la señal 1 no es suficiente para activar un linfocito T, a tal punto que la sola estimulación del receptor de la célula T induce un estado de anergia celular, donde la célula se torna refractaria a la estimulación posterior (26). Para activar apropiadamente a un linfocito T se requiere entonces de una señal alterna o coestimulación (señal 2), la cual resulta de la interacción de proteínas de la membrana del linfocito T con sus respectivos ligandos expresados en la membrana de la célula presentadora de antígenos (B7-CD28, CD40-CD40L) (Figura 7) (23). Esta segunda señal es la que en general determina la respuesta del linfocito T y está relacionada con el reconocimiento por parte de la célula presentadora de ciertos patrones moleculares asociados con patógenos que ingresan al organismo (38). Las células dendríticas y los macrófagos expresan en su membrana una serie de receptores, receptores para patrones moleculares, que reconocen ciertos patrones presentes en las moléculas de los diferentes microorganismos e incluso de células eucariotas (23,31). La generación de estos receptores le ha permitido al sistema inmunitario diferenciar patrones moleculares en diferentes microorganismos y de esta manera diferenciar, por medio de estos, entre antígenos propios y antígenos extraños (39). Un ejemplo de receptores para patrones moleculares lo constituyen los miembros de la familia de receptores tipo Toll (Toll like receptors, TLR), una proteína de la *Drosophila melanogaster* relacionada con la diferenciación dorso-ventral durante el desarrollo embrionario y con la respuesta inmune frente a hongos (40). En los eucariotes los TLR reconocen diferentes patrones moleculares asociados a bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus, levaduras e incluso ácidos nucleicos humanos (40,41,42). La señal trasmitida por los TLR inicia el reclutamiento de diferentes mediadores intracelulares que aumentan la translocación del NF-kB del citoplasma al núcleo, donde finalmente se incrementa la transcripción de los genes para citoquinas pro inflamatorias como la IL-12 y el interferón α y para moléculas coestimuladoras como la B7-1 (40). De esta manera el reconocimiento de patrones moleculares microbianos se traduce en la expresión de señales coestimuladoras (señal 2) y en la activación de linfocitos T, una vez éstos interactúan con sus respectivos antígenos (señal 1). Si bien es cierto que los principales ligandos para los TLR son patrones moleculares micro-

FIGURA 7.
Modelo de las dos señales de activación de la célula T.



bianos, también es cierto que algunos patrones moleculares presentes en las moléculas de las células eucariotas, y entre ellas las humanas, son ligandos para estos receptores. Un claro ejemplo lo constituyen ciertos secuencias CpG hipometiladas presentes tanto en el DNA bacteriano como en el DNA humano, aunque en proporciones menores (43,44). Durante la apoptosis se generan, gracias al clivaje internucleosomal del DNA, nucleosomas y otros macrocomponentes derivados de la cromatina los cuales son empacados en los cuerpos apoptóticos y expuestos en su membrana externa (34). Gracias al reconocimiento y a la fagocitosis oportuna, por parte de los fagocitos, de estos productos de degradación de la cromatina, la mayoría del material cromático es degradado y convertido en aminoácidos y bases nitrogenadas que no tienen actividad antigénica alguna. Sin embargo bajo ciertas condiciones medioambientales, como el estrés y el trauma, la tasa de apoptosis aumenta, saturando la maquinaria de depuración y así aumentando la vida media y la exposición de estos nucleosomas a condiciones adversas, como el incremento de radicales libres, que se asocian a la generación de nuevos ligandos para los TLR (34,45). Estos ligandos han sido denominados patrones moleculares asociados a la muerte celular (DAMP; death associated molecular patterns) (46). El reconocimiento de estos patrones moleculares por parte de TLR 9 presente en la superficie de linfocitos B y en células dendríticas dispara vías de señalización que resultan en la producción de autoanticuerpos por parte de la célula B y la expresión de moléculas coestimuladoras por parte de la célula dendrítica, tornándose así en una célula capaz de activar linfocitos T (46,47,48,49). En este contexto si dentro del repertorio inmunológico (véase selección negativa) este individuo tiene linfocitos T y B autorreactivos contra componentes del nucleosoma (DNA, histonas), el reconocimiento simultáneo de estos nucleosomas tanto por el receptor antigénico de los linfocitos como por el TLR 9 de estos o de las células dendríticas, puede disparar la actividad de estas células autorreactivas e iniciar una reacción autoinmune (48,49,50,51,52).

Eliminación de células apoptóticas

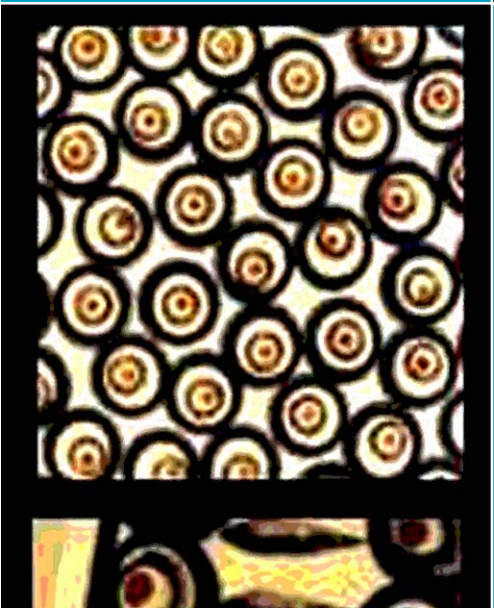
Durante el proceso apoptótico la membrana celular experimenta una serie de cambios estructurales y moleculares que se traducen en la formación de vesículas en la superficie celular y en la expresión de una serie de moléculas, poco usuales en la superficie celular, las cuales son reconocidas directamente por receptores de membrana de los fagocitos e indirectamente al ser opsonizadas por otras moléculas presentes en el medio extracelular (Tabla 4 y Figura 5) (34,53). Dentro de estos receptores se encuentran, entre otros, las integrinas, receptores para manosa, receptores barrenderos (scavenger) y receptores de complemento (Tabla 4) (54,55,56). Una vez activados, estos receptores inician la endocitosis y posterior degradación de las células apoptóticas y sus residuos (54). Sin embargo, bajo un contexto genético que predispone a ciertos individuos a enfermedad autoinmune (ciertos polimorfismos en estos mismos receptores), la eficiencia de éstos disminuye y por lo mismo la depuración de la células apoptóticas (57-64). Bajo estas condiciones se incrementa el tiempo de vida y la cantidad de productos de degradación de la cromatina como los nucleosomas, la exposición de éstos al estrés oxidativo y la generación de nuevos DAMPs (65).

Referencias

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Apoptosis. En: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: WB Saunders Co, 2005.
2. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. Oncogene 2003; 22:8543-67
3. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281:1312-6
4. Martin DA, Elkon KB. Mechanism of apoptosis. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30: 441-54
5. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev 2003; 17:2481-95
6. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, et al. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. Nat Immunol 2000;1:469-74
7. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 2002; 20:323-70
8. Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, et al. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. Immunol Rev 1995; 146:211-21
9. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene 2003; 22:8590-7
10. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med 1994; 179:1317-30
11. Mevorach D. Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 2000; 926:226-35
12. Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol 1998; 10:172-80
13. Arstila TP. A direct stimate of the human T cell receptor diversity. Science 1999; 286:958-961
14. Medzhitov R, Janeway CA. How does the immune system distinguish self from nonself?. Semin Immunol 2000; 12:185-8
15. Kamradt T, Mitchinson NA. Tolerance and Autoimmunity. N Eng J Med 2001; 334:655-64
16. Gommerman JL, Carroll MC. Negative selection of B lymphocytes: a novel role for innate immunity. Immunol Rev 2000; 173:120-30
17. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. Ann Rev Immunol 1993; 11:331-60
18. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: Deleting and tuning lymphocyte repertoires. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:2264-71
19. Von Boehmer H. Positive selection. Cell 1994; 76:219-28
20. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol 2003; 21:139-76
21. Nossal G. Negative selection of lymphocytes. Cell 1994; 76:229-39
22. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, et al. Tolerance in T cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. Nature 1988; 333:742-6
23. Ohashi PS, DeFranco AL. Making and breaking tolerance. Curr Opin Immunol 2002; 14:744–59
24. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. Nature 2002; 415:922-6
25. Starzl TE, Zinkernagel RM. Antigen location and migration in immunity and tolerance. N Eng J Med 1998; 339:1905-13

26. Schwartz RV. Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism?. J Exp Med 1996; 184:1-8
27. Tivol EA, Schwietzer AN, Sharpe AH. Costimulation and autoimmunity. Curr Opin Immunol 1996; 8:822-30
28. Annacker O, Pimenta-Araújo R, Burlen-Defranoux O, et al. On ontogeny and physiology of regulatory T cells. Immunol Rev 2001; 182:5-17
29. Mason D. Some quantitative aspects of T cell repertorie selection: the requirement for tegulatory T cells. Immunol Rev 2001; 182:80-8
30. Lenardo M, Chan FK, Hornung F, et al. Mature T lymphocytes apoptosis-immune regulation in a dynamic and predictable antigenic environment. Ann Rev Immunol 1999; 17:221-253
31. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392:245-252.
32. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, et al. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. Annu Rev Immunol 1993; 11:729-66
33. Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. Arthritis Res 2000; 2:101-14
34. Hall JC, Casciola-Rosen L, Rosen A. Altered structure of autoantigens during apoptosis. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30: 455-71
35. Thomas DA, Du C, Xu M, et al. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. Immunity 2000; 12: 621-32
36. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, et al. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. J Exp Med 1999; 190:815-26
37. Shresta S, Heusel JW, Macivor DM, et al. Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. Immunol Rev 1995; 146:211-21
38. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 2002; 296:298-300
39. Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20:197-216
40. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 2003; 21:335-76
41. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000; 408:740-5
42. Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. Crit Rev Immunol 2003; 23:15-44
43. Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol 2002; 20:709-60
44. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsivemess to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:9237-42
45. Doyke HA, Mamula MJ. Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens. Curr Opin Rheumatol 2002; 14:244-9
46. Mevorach D. The role of death-associated molecular patterns in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30:487-504
47. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, et al. Cutting Edge: role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. J Immunol 2001; 167:3555-8
48. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature 2002; 416:603-7
49. Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, et al. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. J Immunol 1999; 163:130-6
50. Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, et al. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. Immunity 2003; 19:837-47
51. Cooke MS, Mistry N, Wood C, et al. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species–implications for anti-DNA antibodies in lupus. Free Radic Biol Med 1997; 22:151-9
52. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AH, et al. Immune complexes activate autoreactive B cells by co-engagement of sIgM and Toll-like receptors. Nature 2002; 419:603-7
53. Mohan C, Adams S, Stanik V, et al. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. J Exp Med 1993; 177:1367-81
54. Kim SJ, Gershov D, Ma X, et al. Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. Ann N Y Acad Sci 2003; 987:68-78
55. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. J Immunol 2002;169:3978-86
56. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, et al. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. J Exp Med 1998; 188:2313-20
57. Mitchell DA, Pickering MC, Warren J, et al. C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. J Immunol 2002; 168:2538-43
58. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nat Genet 1998; 19:56-9
59. Ehrenstein MR, Cook HT, Neuberger MS. Deficiency in serum immunoglobulin IgM predisposes to development of IgG autoantibodies. J Exp Med 2000; 191:1253-8
60. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. Nat Genet 2001; 28:313-4
61. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41:1241-50
62. Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet 2004; 13:137-47
63. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, et al. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. J Exp Med 2002; 196:135-40
64. Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, et al. Dendritic cell presentation of antigens from apoptotic cells in a proinflammatory context: role of opsonizing anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Arthritis Rheum 1999; 42:1412-20
65. Lunec J, Herbert K, Blount S, et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine: a marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. FEBS Lett 1994; 348:131-8

SECCIÓN II



El Mosaico de la Autoinmunidad

16

AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDAD AUTOINMUNE: EL MOSAICO DE LA AUTOINMUNIDAD

Yehuda Shoenfeld
Juan-Manuel Anaya

Contenido

Definición de la autoinmunidad
- Autoinmunidad y enfermedad autoinmune
- ¿Qué es lo propio?

Factores asociados con enfermedades autoinmunes
- La enfermedad autoinmune es multifactorial
  - Factores genéticos
  - Factores hormonales
  - Factores ambientales

Avances recientes en inmunología y genética han producido una mejor apreciación del mosaico de la autoinmunidad. En el presente capítulo se describen las definiciones y teorías acerca de la autoinmunidad y de la enfermedad autoinmune, se revisan tanto los mecanismos celulares y humorales que actúan en la génesis de éstas, así como los factores que se creen responsables para su desarrollo.

Mosaico
El proceso de realizar dibujos o diseños colocando pequeños pedazos de piedras de colores, vidrios, baldosas, etc, en una mezcla.

Introducción

Desde que las enfermedades autoinmunes (EAI) fueron reconocidas por primera vez, los médicos se han maravillado con el mosaico de la autoinmunidad. El hecho de que dos hermanas, hijas de los mismos padres, con un fondo hormonal similar y que viven en áreas cercanas puedan desarrollar EAI tan diferentes como lo son la Diabetes Mellitus tipo 1A (DMT1A) y el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), parece inexplicable. Avances recientes en inmunología y genética han permitido una mejor apreciación de los elementos que cada individuo adquiere durante su vida (esos "colores", "vidrios" o "baldosas") y la mezcla genética dentro de la cual estos factores son puestos para generar el mosaico de la autoinmunidad. En el presente capítulo se describirán las definiciones y teorías más aceptadas acerca de la autoinmunidad, se revisarán tanto los mecanismos celulares y humorales que actúan en el desarrollo de la misma y los factores que se creen responsables para su desarrollo. Estas descripciones son seguidas por una discusión de las razones por las cuales la autoinmunidad se manifiesta en formas tan diversas. Por último, se discutirá cómo la autoinmunidad es al mismo tiempo benéfica y perjudicial para el huésped y cómo se podría manipular terapéuticamente.

Definición de autoinmunidad

Autoinmunidad y enfermedad autoinmune

La autoinmunidad es una condición en la cual el huésped organiza una respuesta inmune contra lo propio. Esta simple definición, sin embargo, puede prestarse para confusiones dados los conceptos actuales de inmunología. Recientes descubrimientos en este campo han llevado a una revisión total de términos como autoinmunidad, enfermedad autoinmune y sobre qué es lo propio.

Si se acepta que la autoinmunidad incluye cualquier respuesta inmune contra lo propio, entonces el término de respuesta autoinmune debe incluir al menos cuatro posibilidades. La primera es la autoinmunidad fisiológica, la cual es saludable para el huésped. Un ejemplo de este tipo es la respuesta antiidiotipo normal que el huésped monta para modular la respuesta mediada por anticuerpos, como podría ocurrir luego de una infección aguda (1). Además, existe un grupo de autoanticuerpos denominados autoanticuerpos naturales, cuya función es eliminar detritus del organismo. Una segunda posibilidad de respuesta autoinmune es también saludable para el huésped, pero con alguna anormalidad, como sucede en la respuesta inmune contra células transformadas en pacientes que sufren enfermedades malignas o infecciones intracelulares (1). Una tercera posibilidad es la respuesta autoinmune patológica en un huésped con anormalidades, característica de los síndromes paraneoplásicos (2). En estos casos, la respuesta inmune contra las células malignas reacciona con los antígenos normales generando enfermedad autoinmune (ver Capítulo 21). La última posibilidad es en realidad la más asociada con el término de enfermedad autoinmunine, y la más relevante para este capítulo. Ésta corresponde a la respuesta autoinmune patológica en un huésped previamente sano, tal como sucede en pacientes con LES, DMT1A o hipotiroidismo. De esta manera, las dos primeras posibilidades prueban que no todas las condiciones autoinmunes son patológicas.

La tolerancia inmune puede ser definida como el reconocimiento por parte del sistema inmune de antígenos propios sin generar enfermedad. Esta tolerancia inmunológica fue postulada hace 50 años, pero sus bases multifactoriales siguen siendo polémicas. La tolerancia se genera en dos niveles. El «nivel superior», o tolerancia central, se lleva a cabo sobre todo en la vida fetal, y el «nivel inferior», o tolerancia periférica, se desarrolla en la etapa postnatal (ver Capítulo 6). Mientras la autoinmunidad es un fenómeno fisiológico, la enfermedad autoinmune es un síndrome clínico causado por la pérdida de la tolerancia inmune, caracterizada por la activación de las células de T o de las células de B, o ambas, que conducen a daño tisular (patología) en ausencia de una causa evidente.

¿Qué es lo propio?

El dogma antiguo había mostrado la respuesta inmune contra lo extraño como algo normal, y la respuesta contra lo propio como patológica. Luego de conocer que tanto mecanismos de respuesta celular y humoral responden a células transformadas (por ejemplo, malignas o infectadas), el término extraño se amplió para incluir "lo propio alterado". Con el tiempo este concepto ha mostrado ser inadecuado, y datos recientes han permitido redefinir los términos de propio y extraño.

El término "propio" se ha expandido para incluir en su definición varios tipos de propio: lo propio nativo (por ejemplo, DNA nativo de doble cadena), complejos de lo propio (ej. β-2-glicoproteína I [β2GPI] unida a la cardiolipina); y lo propio alterado (ej. lipoproteínas de baja densidad [LDL] oxidadas) (3). El hecho que lo propio nativo, los complejos y las formas alteradas puedan inducir cada una de ellas enfermedades autoinmunes ha sido crítico para entender y clasificar los procesos autoinmunes. Debido a que la línea que separa lo propio de lo extraño se ha vuelto significativamente más difícil de diferenciar, la necesidad de crear definiciones más precisas de autoinmunidad se ha convertido en algo muy importante.

Factores asociados con enfermedades autoinmunes

La enfermedad autoinmune es multifactorial

El número de mosaicos en la galería de las EAI continúa expandiéndose a un paso rápido y continuo. Los cri-

terios para clasificar una enfermedad como autoinmune está señalados en la Tabla 1. Además, existen criterios propios para la clasificación de la mayoría de las EAI. Los factores que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades, denominados aquí como las piezas del mosaico, también continúan conociéndose mejor. Dado que diversas categorías se pueden sobreponer entre sí, los factores asociados con el desarrollo de la autoinmunidad se pueden clasificar en genéticos, inmunológicos, hormonales y ambientales (Tabla 2).

Factores genéticos

Es evidente que la genética tiene un rol en la autoinmunidad. Los pacientes con EAI, de forma frecuente, tienen familiares con la misma o con otra EAI (5) (Tabla 3). Sumado a esto, familiares en primer grado de los pacientes tienen una mayor prevalencia de autoanticuerpos sin presentar evidencia clínica de enfermedad (4). Estudios en gemelos con LES y artritis reumatoide (AR) (6), además de estudios familiares múltiples sobre LES y diabetes autoinmune (7,8) prueban que la etiología de las EAI es multifactorial y que, desde el punto de vista genético, estas enfermedades son complejas, es decir, su herencia no es mendeliana y son poligénicas. Las EAI se desarrollan en individuos genéticamente susceptibles y su expresión clínica es modificada por ambientes permisivos y protectores.

Antígeno Leucocitario Humano (HLA)

La región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), ubicada en el brazo corto del cromosoma 6, con una extensión cercana a los 4 MB, está divida en clase I, clase II y clase III, e incluye genes que codifican moléculas HLA, genes que codifican otras moléculas involucradas en la respuesta inmune, y genes que codifican moléculas aparentemente no relacionadas con el sistema inmuno-

Tabla 1. Criterios para clasificar una enfermedad como autoinmune en humanos.

I. Evidencia directa
- A. Mediada por anticuerpos
  - 1. Anticuerpos circulantes que alteran la función
    - a. destrucción o secuestro de una célula blanco
    - b. interacción con un receptor
      - 1) estimulan la función
      - 2) disminuyen la función
    - c. interacción con hormonas o enzimas
  - 2. Anticuerpos localizados
    - a. demostración de inmunoglobulinas o componentes del complemento en el sitio de la lesión
    - b. capacidad de obtener anticuerpos de las lesiones
    - c. reproducción de las lesiones por los anticuerpos obtenidos
  - 3. Complejos inmunes localizados en el sitio de la lesión
    - a. obtención de complejos antígenos-anticuerpos
    - b. identificación del antígeno
  - 4. Reproducción de la enfermedad por transferencia pasiva
    - a. transferencia materno-fetal
    - b. transferencia a animales de experimentación
    - c. demostración del daño a la célula blanco in vitro
- B. Mediada por células
  - 1. Proliferación de células T in vitro en respuesta a autoantígenos
  - 2. Transferencia de células T a ratones inmunodeficientes implantados con el órgano blanco
  - 3. Citotoxicidad de las células T in vitro con células del órgano blanco.

II. Evidencia indirecta
- A. Reproducción de la enfermedad autoinmune por inmunización experimental
  - 1. Identificación del antígeno iniciador
  - 2. Inmunización de un huésped susceptible, singénico con antígenos análogos
  - 3. Producción de lesiones características
  - 4. Reacción de anticuerpos o células T con un antígeno o epítope análogo
- B. Reproducción de la enfermedad autoinmune a través de idiotipos
  - 1. Identificación de idiotipos asociados con la enfermedad
  - 2. Inmunización de huésped susceptible con el idiotipo
  - 3. Producción de la lesión característica
- C. Modelos animales espontáneos
  - 1. Identificación de la enfermedad en un modelo experimental
  - 2. Reproducción y selección para incrementar la frecuencia de la enfermedad
  - 3. Demostración de anticuerpos o células T autorreactivas
  - 4. Transferencia pasiva/transferencia adoptiva a receptores singénicos
- D. Modelos animales producidos por la disrregulación del sistema inmune
  - 1. Timectomía neonatal
  - 2. Irradiación con timectomía
  - 3. Animales homólogos con deficiencias innatas de citoquinas
  - 4. Animales transgénicos con alteraciones en:
    - a. producción de citoquinas
    - b. expresión de antígenos
    - c. expresión de factores coestimulatorios

III. Evidencia circunstancial
- A. Presencia de autoanticuerpos
- B. Asociación con otras EAI
- C. Asociación con genotipos del MHC
- D. Infiltración linfocítica del órgano blanco
  - 1. Presencia de centros germinales en las lesiones
  - 2. Células T infiltrantes restringidas en gen V
- E. Respuesta favorable a la inmunosupresión
  - 1. No específica
  - 2. Específica (incluyendo tolerancia oral)

Tabla 2. Ejemplos de las piezas mayores en el mosaico de la autoinmunidad.

1. Genéticos	HLA y no HLA		
2. Inmunológicos	Deficiencias humorales		
		Defectos primarios	
			Defectos congénitos en proteínas del Complemento (ej. Deficiencias de C1q, C4, o C2) Deficiencias de PAS Deficiencias de DNAasa I Deficiencia de IgA
		Defectos secundarios	
			Defectos adquiridos del complemento (ej. AEH)
	Defectos celulares		
		Defectos primarios	
			Deficiencias Fas/Fas Ligando Polimorfismos de receptor Fcγ RIII
		Defectos secundarios	
			Infección por VIH
3. Hormonales	Efectos del género		
	Embarazo		
	Lactancia		
	Prolactina		
	DHEA		
4. Ambientales	Agentes infecciosos		
	Medicamentos y vacunación		
	Toxinas		
	Luz ultravioleta		
	Situaciones estresantes físicas y psicológicas		

PAS: proteína amiloide sérica; IgA: Inmunoglobulina A; AEH: angioedema hereditario; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; DHEA: dehidroepiandrosterona.

lógico. La mayoría de las moléculas de HLA clase I están involucradas en inmunorregulación, siendo la mayor excepción el gen HLA-HFE, cuya mutación está asociada con la presencia de la hemocromatosis hereditaria (9). La región de clase II contiene los clásicos genes HLA II, como los genes Lmp y Tap, cuyos productos participan en el procesamiento y presentación antigénica por moléculas HLA de clase I y II (10). La región de clase III incluye numerosas moléculas involucradas en la inmunorregulación, entre las cuales sobresalen los componentes del complemento C4, C2 y factor B; factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; proteínas de choque térmico como la HSP70 y la enzima 21-hidroxilasa, importante para la síntesis de esteroides (11). La presencia de este último gen en esta región de respuesta inmune puede estar relacionada con influencias hormonales en la respuesta inmunológica.

El primer vínculo entre EAI y genes del HLA data de los años 70 con el descubrimiento de la asociación entre el HLA-B27 y la espondilitis anquilosante (12) y el HLA-DR4 con la AR (13). Desde entonces, numerosas EAI han sido asociadas con el HLA clase I y II (Tabla 3). Sin embargo, sin importar cuán importantes son estos genes en el desarrollo de las EAI, ellos por sí solos no son suficientes para causar la patología. Primero, no a todos los individuos que tienen un genotipo particular les da la enfermedad. Segundo, no todos los individuos con una patología asociada al HLA poseen los mismos genes HLA. Tercero, múltiples enfermedades han sido asociadas con el mismo genotipo. Por ejemplo, el LES, la tiroiditis autoinmune, el síndrome de Sjögren, la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiforme han sido asociadas cada una al HLA-DRB1*0301 (Tabla 3). El estudio de los haplotipos extendidos del HLA ha permitido predecir mejor la sus-

Tabla 3. Ejemplos de EAI asociadas con moléculas HLA clase II.

Enfermedad	HLA
Espondilitis anquilosante	B27
Síndrome de Reiter	B27
Uveítis anterior aguda	B27
Artritis reumatoidea	DR4
Pénfigo vulgar	DR4
Lupus eritematoso sistémico	DR3
Síndrome de Sjögren	DR3
Enfermedad de Graves	DR3
Enfermedad celiaca	DR3
Dermatitis herpetiforme	DR3
Diabetes mellitus insulino-dependiente	DR3
Tiroiditis de Hashimoto (variante atrófica)	DR3
Síndrome de Goodpasture	DR2
Esclerosis múltiple	DR2

ceptibilidad a estas enfermedades (14-16), diversos patrones de las enfermedades (17) e, incluso, protección de complicaciones específicas (16). Refinamientos futuros en la genotipificación del HLA y el estudio del MHC profundizarán nuestro entendimiento del papel de estos genes en el desarrollo de las EAI (ver Capítulo 18).

Múltiples hipótesis pretenden explicar cómo alelos del HLA confieren susceptibilidad para enfermedades particulares. Errores en la selección HLA-péptido-linfocito T en el timo, en moléculas HLA plegadas o en la presentación antigénica por células presentadoras de antígenos (APC) en el contexto de proteínas HLA específicas, han sido propuestos (18). No obstante, las proteínas del HLA por ellas mismas pueden no ser las que determinen directamente la enfermedad. Deficiencias en moléculas del complemento (19) asociadas con genotipos particulares del HLA pueden causar enfermedades por una opsonización deficiente de agentes infecciosos o una depuración disminuida de complejos inmunes (20). Voluntarios sanos portadores del genotipo HLA-DRB1*0301 tienen una depuración disminuida de complejos inmunes preformados cuando éstos son inyectados (21), similar a pacientes con EAI y animales sanos con deficiencias congénitas del complemento (20). Quizás incluso más interesante, los pacientes con angioedema hereditario (AEH, la deficiencia del inhibidor estearasa del C1), una enfermedad no ligada al HLA (22), tienen una deficiencia secundaria de C4, disrregulación linfocitaria y una mayor prevalencia de EAI. Aquellos pacientes con AEH que desarrollan además una enfermedad autoinmune, presentan una enfermedad ligada a su genotipo HLA particular (23). Es esta forma, mientras la deficiencia secundaria del complemento parece predisponer a los pacientes al desorden de inmunorregulación, el genotipo del HLA determina eventualmente cuál enfermedad autoinmune manifestará el paciente. Estos datos apoyan, una vez más, el origen multifactorial de las EAI.

Factores genéticos no HLA

Tanto en animales como en humanos, las EAI se han vinculado con factores genéticos no pertenecientes al MHC. Diversos genes como Race (24), genotipos de los receptores Fcγ (26), Dnasa I (27) y proteína sérica del amiloide (Psa) (27), así como varios genes asociados con el proceso de apoptosis (25) sólo son unos pocos de los factores genéticos no pertenecientes al MHC incriminados en la predisposición para EAI (ver Capítulo 19).

No todo es genético

A pesar de lo anterior, la genética no es el determinante final para el desarrollo de las EAI. Si un único gen fuera por sí sólo el responsable de las EAI, los gemelos monocigóticos mostrarían una concordancia del 100% para la patología específica, no como en realidad ocurre en patologías como el LES y la AR, donde se ha reportado concordacias entre gemelos monocigóticos del 57% y 34% respectivamente (27). Esta situación indica el ya mencionado carácter poligénico de las EAI. Otros factores que influyen en la génesis de las EAI son las hormonas y el medio ambiente.

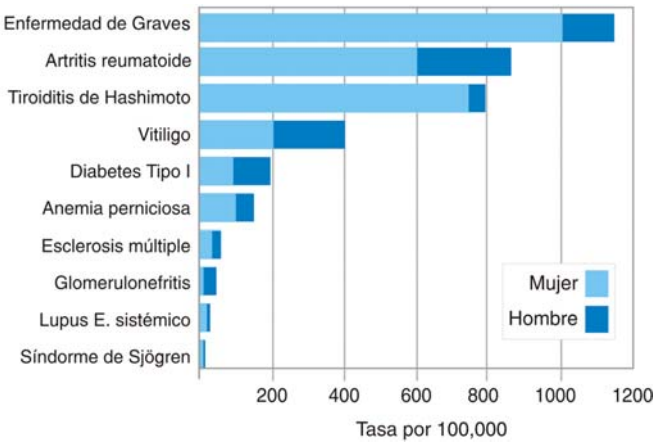
Factores hormonales

Estrógenos

Las hormonas son factores significativos en el origen de las EAI (Tabla 2) (28,29). Existe una predilección de la mayoría (ej. LES y AR), pero no todas las EAI, por el sexo femenino (Figura 1). Es interesante resaltar que los pacientes que padecen el síndrome de Klinefelter (XXY), con un genotipo feminizante, también presentan una alta prevalencia de LES (30). Los modelos animales de EAI muestran predilecciones similares. Por ejemplo, una camada de ratones obtenidos del cruce de ratones New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW) presentan una enfermedad semejante al LES. Las hembras NZB/NZW mueren debido a una enfermedad renal más temprano que los compañeros machos de la misma camada. La castración y manipulación hormonal de la primera generación (F1) de los ratones NZB/NZW afecta el desarrollo de la enfermedad, produciendo la feminización un empeoramiento de la patología, mientras que la masculinización disminuye la progresión de la enfermedad (31).

No obstante, la preponderancia de las hormonas sexuales en las EAI es incierta. Tanto en los humanos como en modelos animales, algunas EAI tienen una predilección por el género masculino sobre el femenino. Además, las mujeres pueden desarrollar LES después de la menopausia (32). Sumado a esta circunstancia, el danazol, un andrógeno semisintético utilizado, en ocasiones, en el manejo de algunas EAI puede inducir LES en algunos pacientes (33). El estudio "The Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment" (SELENA), de largo seguimiento, doble ciego, multicéntrico y controlado con placebo, está investigando los efectos de los estrógenos en el LES, y sus resultados arrojarán una luz considerable sobre este importante aspecto (32).

Figura 1.
Prevalencia de las enfermedades autoinmunes.



Otras hormonas

Diferentes hormonas incluyendo la dehidroepiandrosterona (DHEA) (34), la progesterona (35) y la prolactina (36) parecen tener propiedades inmunorregulatorias. Su papel en las EAI es actualmente objeto de muchas investigaciones (ver Capítulo 14).

Factores ambientales

Los factores ambientales (Tabla 2) han sido implicados en el desarrollo de las EAI, incluyendo entre ellos agentes infecciosos, medicamentos, sustancias químicas, toxinas y luz ultravioleta, entre otros (37,38). El tabaquismo y la obesidad pueden incrementar el riesgo de AR (39,40), reiterando, una vez más, la naturaleza multifactorial de las EAI. Mientras la luz ultravioleta es conocida como factor disparador en LES (41), ha sido al mismo tiempo usada efectivamente para el manejo de la psoriasis, otra enfermedad autoinmune (42). La D-penicilamina, un medicamento usado antaño para tratar EAI como la AR, la escleroderma y la cirrosis biliar primaria, ha sido implicado en el desarrollo de EAI como el LES y la glomerulonefritis (43).

El estrés físico y psicológico han sido implicados en las EAI (44). Numerosos estudios en animales y humanos demuestran el efecto de diversos estresores en la función inmune (45,46). Sin embargo, su papel exacto en el desarrollo de las EAI en humanos es poco entendido (47).

Inicio de la enfermedad autoinmune

Varios factores señalados en la Tabla 2 deben coincidir para la iniciación de la autoinmunidad. Como mínimo, éstos implican una predisposición genética, linfocitos vírgenes que puedan reaccionar contra autoantígenos y un acontecimiento que precipite la activación de linfocitos T y/o B. Las variaciones interindividuales en estos factores explican probablemente la complejidad significativa

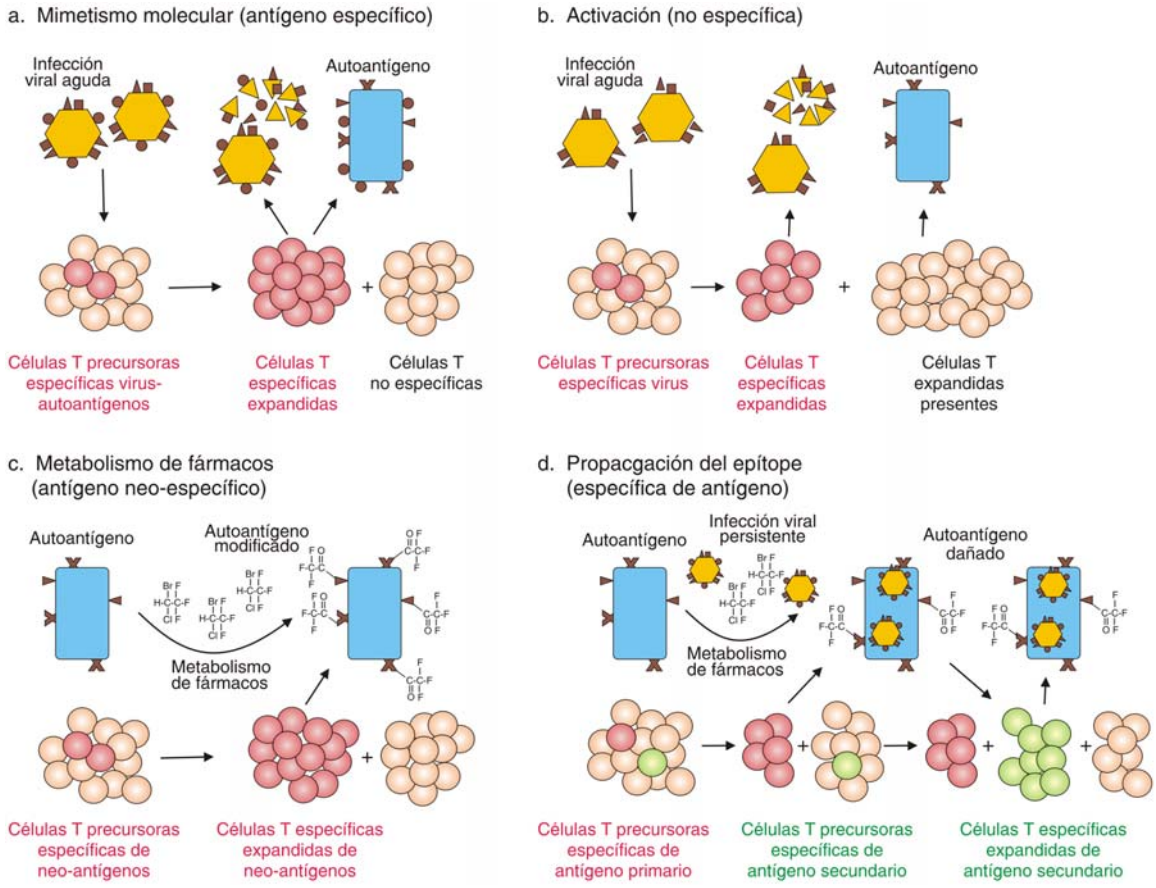

a. Mimetismo molecular (antígeno específico)
Infección viral aguda
Autoantígeno
Células T precursoras específicas virus-autoantígenos
Células T específicas expandidas
Células T no específicas
b. Activación (no específica)
Infección viral aguda
Autoantígeno
Células T precursoras específicas virus
Células T específicas expandidas
Células T expandidas presentes
c. Metabolismo de fármacos (antígeno neo-específico)
Autoantígeno
Autoantígeno modificado
Metabolismo de fármacos
Células T precursoras específicas de neo-antígenos
Células T específicas expandidas de neo-antígenos
d. Propacgación del epítope (específica de antígeno)
Autoantígeno
Infección viral persistente
Autoantígeno dañado
Metabolismo de fármacos
Células T precursoras específicas de antígeno primario
Células T precursoras específicas de antígeno secundario
Células T específicas expandidas de antígeno secundario

FIGURA 2.

Mecanismos de pérdida de la tolerancia inmune.

a. El mimetismo molecular que ocurre en infecciones en donde la respuesta inmune ataca tanto al virus como al propio individuo. b. Las infecciones microbianas pueden causar respuestas inflamatorias masivas en el anfitrión que activan de manera policlonal las células de T de una manera no específica del antígeno. En este caso, la suma de todas las células no propiamente activadas son las que causan el daño, más que algunas células individuales específicas. Además, esta activación refuerza el efecto de otros mecanismos perjudiciales, por ejemplo el mimetismo molecular y la propagación del epítope. c. El metabolismo de un medicamento puede causar modificaciones en una proteína convirtiéndola en un neoantígeno. d. La propagación del epítope puede ocurrir como resultado del daño tisular causado por una infección o por toxicidad directa de un medicamento. La respuesta inmune autoagresiva (enfermedad autoinmune) es dirigida contra autoantígenos secundarios que son expuestos luego de que la célula blanco ha sido dañada o afectada por la inflamación, infección viral o bacteriana, algunas drogas o un ataque específico directo (antígeno-específico) (adaptado de 48).

asociada con las EAI. Aspectos cuantitativos son también importantes porque las manifestaciones clínicas sólo son evidentes si una cantidad suficiente de células han sido destruidas (por citotoxicidad y/o apoptosis). Por lo tanto, la presencia de linfocitos autorreactivos no siempre significa enfermedad. La cinética de su generación, su cantidad y la regulación de sus funciones de activación y efectoras (papel destructivo versus regulador) determinará el resultado final y hará la diferencia entre autoinmunidad subclínica y enfermedad (48).

Haplotipos del MHC pueden influir en la susceptibilidad a una enfermedad aumentando la presentación de epítopes del péptido inmunogénico en la periferia, dando como resultado la activación aumentada de la célula T, o por la presentación ineficaz de autoantígenos en el timo, originando células T más agresivas o menos números de células T reguladoras (Treg). El timo es el centro de control donde las células T potencialmente agresivas con especificidad para los autoantígenos se eliminan y donde se seleccionan los linfocitos Treg CD4+CD25+ que reconocen autoantígenos.

La expresión del antígeno en el timo controla la manifestación de la autoinmunidad de dos maneras: forma el repertorio agresivo de la célula de T y el repertorio de la célula Treg, que son específicos para los autoantígenos. Es probable que las especificidades antigénicas exactas de ambos repertorios determinen, en última instancia, cuáles serán los órganos en los que se llevará a cabo la respuesta autoinmune. Ha sido demostrado que diferentes Treg controlan la respuesta autoinmune en diferentes sitios (49). Además, los linfocitos Treg se encuentran disminuidos en las EAI (ver Capítulo 10). En este sentido, experimentalmente ha sido observada mayor autoinmunidad en ratones que carecen de células Treg (50).

Las infecciones son las primeras candidatas para iniciar el proceso de autoinmunidad en individuos predispuestos, porque inducen respuestas inflamatorias importantes en varios órganos y pueden, por lo tanto, atraer una multiplicidad de linfocitos potencialmente autorreactivos al sitio de la infección. En la Figura 2 se resumen los principales mecanismos por los cuales una infección puede iniciar o modular la autoinmunidad, rompiendo la tolerancia inmune.

El comienzo de la enfermedad autoinmune es un proceso multifactorial y complejo que requiere de componentes genéticos que sinergizen con acontecimientos ambientales. Es probable que polimorfismos genéticos humanos y su asociación con la autoinmunidad sean identificados en el cercano futuro, y se profundice en los detalles exactos de cómo la predisposición genética es determinante en la susceptibilidad para las EAI. Igualmente, se espera que se identifiquen disparadores ambientales adicionales, como por ejemplo infecciones virales o exposición a drogas o productos químicos. Estos descubrimientos permitirán diseñar estrategias que apunten a la prevención de estas enfermedades antes de su inicio. También, se tiene la esperanza que en un futuro próximo se cuente con nuevos tratamientos que inactiven específicamente respuestas autoagresivas inmunes o funciones reguladoras específicas de antígenos.

Referencias

1. Shoenfeld Y. Common infections, idiotypic dysregulation, autoantibody spread and induction of autoimmune diseases. J Autoimmun 1996; 9: 235-239
2. Lernmark A. Immune surveillance: Paraneoplastic or environmental triggers of autoimmunity. Crit Rev Immunol 1997; 17: 437-447
3. Zurgil N, Levy Y, Deutsch M, et al. Reactivity of peripheral blood lymphocytes to oxidized low-density lipoprotein: a novel system to estimate atherosclerosis employing the Cellscan. Clin Cardiol 1999; 22: 526-532
4. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunology Today 1993; 14: 426-430
5. Vega P, Tobon GJ, Cañas C, et al. Familial autoimmunity in primary Sjögren's syndrome (resumen). Autoimmun Rev 2004;3(suppl. 2):125
6. Shoenfeld Y, Isenberg DA. The mosaic of autoimmunity. Immunol Today 1989; 10: 123-128
7. Criswell LA, Amos CI. Update on genetic risk factors for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2000; 12: 85-90
8. Harley JB, Gray-McGuire. Genetic basis of rheumatic disease. In: Koopman WJ (ed), Arthritis and allied conditions, 2001. Vol. 1, 14th ed., pp 595-606, Williams and Wilkins, Philadelphia
9. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med 1998; 343: 702-709
10. Feder JN. The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. Immunol Res 1999; 20: 175-185
11. Fu Y, Yan G, Shi L, et al. Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. Ann N Y Acad Sci 1998; 842: 138-155
12. Partanen J, Peterson P, Westman P, et al. Major histocompatibility complex class II and III in Addison's disease. MHC alleles do not predict autoantibody specificity and 21-hydroxylase gene polymorphism has no independent role in disease susceptibility. Hum Immunol 1994; 41: 135-140
13. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A. Ankylosing spondylitis and HLA-A27. Lancet 1973; 1: 904-907
14. McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, et al. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1977; 20: 1037-1042
15. Puttick AH, Briggs DC, Welsh KI, et al. Genes associated with rheumatoid arthritis and mild inflammatory arthritis. I. Major histocompatibility complex class I, II, and III allotypes. Ann Rheum Dis 1990; 49: 219-224
16. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. Microsc Res Tech 2000; 50: 216-228
17. Van der Horst Bruinsma IE, Visser H, Hazes JM, et al. HLA-DQ-associated predisposition to and dominant HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis. Hum Immunol 1999; 60: 152-158
18. Panayi GS, Wooley P, Batchelor JR. Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. Br Med J 1978; 2: 1326-1328
19. Colbert RA. HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? Mol Med Today 2000; 6: 224-230
20. Fries LF, O'Shea JJ, Frank MM. Inherited deficiencies of complement and complement-related proteins. Clin Immunol Immunopathol 1986; 40: 37-49
21. Frank MM, Lawley TJ, Gamburger MI, et al. NIH Conference: Immunoglobulin G Fc receptor-mediated clearance in autoimmune diseases. Ann Intern Med 1983; 98: 206-218
22. Lawley TJ, Hall RP, Fauci AS, et al. Defective Fc-receptor functions associated with the HLA-B8/DRw3 haplotype: studies in patients with dermatitis herpetiformis and normal subjects. N Engl J Med 1981; 304: 185-192

23. Brickman CM, Tsokos GC, Chused TM, et al. Immunoregulatory disorders associated with hereditary angioedema. II. Serologic and cellular abnormalities. J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 758-767
24. Brickman CM, Tsokos GC, Chused TM, et al. Immunoregulatory disorders associated with hereditary angioedema. I. Clinical manifestations of autoimmune disease. J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 749-757
25. Oh M, Petri MA, Kim NA, et al. Frequency of the Fc gamma RIIIA-158F allele in African American patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1999; 26: 1486-1489
26. Walport MJ. Lupus, Dnase and defective disposal of cellular debris. Nat Genet 2000; 25: 135-136
27. Winchester RJ, Lahita RG. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG (ed). Systemic lupus erythematosus, 1987. pp 81-120, John Wiley and Sons, New York
28. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol 1999; 11: 352-356
29. Ahmed SA, Talal N. Effects of sex hormones on immune responses and autoimmune diseases: An update. In: Shoenfeld Y (ed), The decade of autoimmunity, 1999. pp 333-337, Elsevier Science B.V, Amsterdam
30. Ortiz Neu C, LeRoy EC. The coincidence of Klinefelter's síndrome and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1969; 12: 241-246
31. Talal N. Natural history of murine lupus. Modulation by sex hormones. Arthritis Rheum 1978; 21 (5 Suppl), S 58-S63
32. Buyon JP. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with systemic lupus erythematosus. J Am Med Womens Assoc 1998; 53: 13-17
33. Guillet G, Sassolas B, Platin P, et al. Anti-Ro-positive lupus and hereditaty angioneurotic edema. A 7-year follow-up with worsening of lupus under danazol treatment. Dermatologica 1988; 177: 370-375
34. VanVollenhoven RF, Morabito LM, Engleman EG, et al. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. J Rheumatol 1998; 25: 285-289
35. VanVollehoven RF, McGuire JL. Estrogen, progesterone, and testosterone: can they be used to treat autoimmune diseases? Cleve Clin J Med 1994; 61: 276-284
36. Walker SE, McMurray RW, Houri JM, et al. Effects of prolactin in stimulating disease activity in systemic lupus erythematosus. Ann N Y Acad Sci 1998; 840: 762-772
37. Aharon Maor A, Shoenfeld Y. The role of ultraviolet light, sun and flourescent light in the patogenesis of systemic lupus erythematosus. Harefuah 1998; 135: 295-299
38. Saraux A, Jouquan J, Le Goff P, et al. Environmental factors may modulate antiphopholipid antibody production in family members of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1999; 42: 1062-1064
39. Karlson EW, Lee IM, Cook NR, et al. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. Arthritis Rheum 1999; 42: 910-917
40. Shovman O, Shoenfeld Y. Smoking, sex hormones, and rheumatoid arthritis: update and developments. Harefuah 2000; 138: 949-951.
41. McGrath H. Ultraviolet A1 (340-400 nm) irradiation and systemic lupus erythematosus. J Investig Dermatol Symp Proc 1999; 4: 79-84
42. Halpern SM, Anstey AV, Dawe RS, et al. Guidelines for topical PUVA: a report of a workshop of the British photodermatology group. Br J Dermatol 2000; 142: 22-31
43. Brik R, Tenenbaum G, Blank M, et al. D-penicillamine-induced autoantibodies in a mouse model. Clin Exp Rheumatol 1995; 13: 483-488
44. Gaillard RC, Spinedi E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. Domest Anim Endocrinol 1998; 15: 345-352
45. Harbuz MS, Conde GL, Marti O, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1997; 823: 214-224
46. Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. Annu Rev Immunol 1995; 13: 307-338
47. Wallace DJ. The role of stress and trauma in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1987; 16: 153-157
48. Christen U, von Herrath MG. Initiation of autoimmunity. Curr Opin Immunol 2004;16:759-67
49. Alyanakian MA, You S, Damotte D, et al. Diversity of regulatory CD4+ T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:15806-11
50. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, et al. CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 2003,171: 3348-52

17

INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO GENÉTICO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Norma C. Serrano
Paula A. Correa
Juan-Manuel Anaya

Una variedad de estudios han demostrado que la predisposición genética es un factor mayor en la susceptibilidad a desarrollar Enfermedades Autoinmunes (EAI). La mayor influencia en la susceptibilidad para autoinmunidad está dada por genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Sin embargo, estudios de ligamiento realizados tanto en humanos como en ratones han mostrado que genes que no pertenecen al complejo mayor de histocompatibilidad (no-MHC) también contribuyen de manera significativa en la susceptibilidad para desarrollar EAI. La identificación de los genes y las vías genéticas involucradas en estas enfermedades han permitido dilucidar mejor los mecanismos que median su patogénesis y abrir la posibilidad a nuevas formas de tratamiento. En el presente capítulo se describen las características genéticas de estas enfermedades y las herramientas que permiten investigar genes candidatos para las mismas.*

* El lector es referido al glosario cuando la palabra (s) esté (n) en azul.

Contenido

Predisposición genética
Estudio de ligamiento
Desequilibrio de ligamiento
- Estudio de asociación
- Poder del estudio
- Estratificación
- Medio ambiente

Aleatorización mendeliana

Predisposición genética

El impacto de la predisposición genética en las EAI fue identificado inicialmente por el análisis de la tasa de concordancia entre gemelos monocigotos (MC) y gemelos dicigotos (DC). Los gemelos MC comparten el 100% de su material genético, mientras que los DC en promedio, comparten el 50% de sus genes. Si al estudiar una serie de gemelos se encuentra que los MC son concordantes para una patología con mayor frecuencia que los DC, puede concluirse que los factores genéticos están, por lo menos, parcialmente involucrados en el origen de la enfermedad (1). Sin embargo, es importante resaltar que en ocasiones existen diferencias entre los gemelos MC. Éstos pueden, por ejemplo, diferir en su repertorio de anticuerpos y receptores de células T, DNA mitocondrial, en mutaciones somáticas, y en el patrón de inactivación del cromosoma X en el caso de las mujeres (2). Por otro lado, los gemelos MC pueden diferenciarse como consecuencia de factores ambientales.

Los estudios de agregación o recurrencia de la enfermedad dentro de una familia han aportado al conocimiento de qué tan fuerte es el componente genético de una enfermedad. En epidemiología genética es factible identificar la presencia de agregación familiar a través de métodos de genética estadística. En este caso, el grado de agregación de una enfermedad se expresa como λ_R, definido como el cociente entre el riesgo de padecer la enfermedad entre los parientes de los casos y la prevalencia de dicha enfermedad en la población general. Esta técnica requiere el cálculo de λ para cada uno de los grados de parentesco.

Para las EAI se ha encontrado tasas de concordancia entre los MC que varían del 15% para artritis reumatoide (AR) hasta porcentajes tan altos como un 57% en Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Tabla 1). La comparación entre las altas tasas de concordancia de los familiares con la de la población general, evidencia que la predisposición genética es un factor dominante en el desarrollo de las EAI. Por otro lado, una menor tasa de concordancia en familiares que en gemelos MC sugiere la presencia de múltiples genes en la predisposición genética para estas enfermedades (3).

Como se puede deducir en la Tabla 1, cuánto más alejado es el grado de parentesco, λ se aproxima más a 1. Es importante destacar que dicha relación no es suficiente para atribuir a las EAI un origen puramente genético. Éstas son el resultado de la compleja interacción entre factores ambientales y múltiples genes, constituyéndose en enfermedades complejas, con herencia multifactorial, en las cuales la correlación entre parientes consanguíneos requiere el análisis de dos componentes: el atribuible a diferencias genéticas y el originado por diferencias en exposiciones a factores ambientales. Para fenotipos discretos (afectado frente no afectado), el modelo estadístico se basa en la premisa de que la predisposición de los individuos dentro de una población constituye una variable continua de distribución variable. Según este modelo, una persona desarrollará la enfermedad sí su nivel de predisposición alcanza y supera el límite umbral (Figura 1). Tanto la susceptibilidad como el umbral pueden ser heredados y las propiedades matemáticas de distribución normal permiten predecir el parámetro λ (3).

El análisis del modelo multifactorial se diseña con el objetivo de estimar la correlación de riesgo entre familiares consanguíneos (4), pero este modelo no tiene la capacidad de discriminar entre lo genético y lo ambiental; por lo que la estimación de la heredabilidad puede ser sobrevalorada; especialmente cuando existen, en familiares consanguíneos, factores ambientales que influyen de manera importante sobre el riesgo de enfermar.

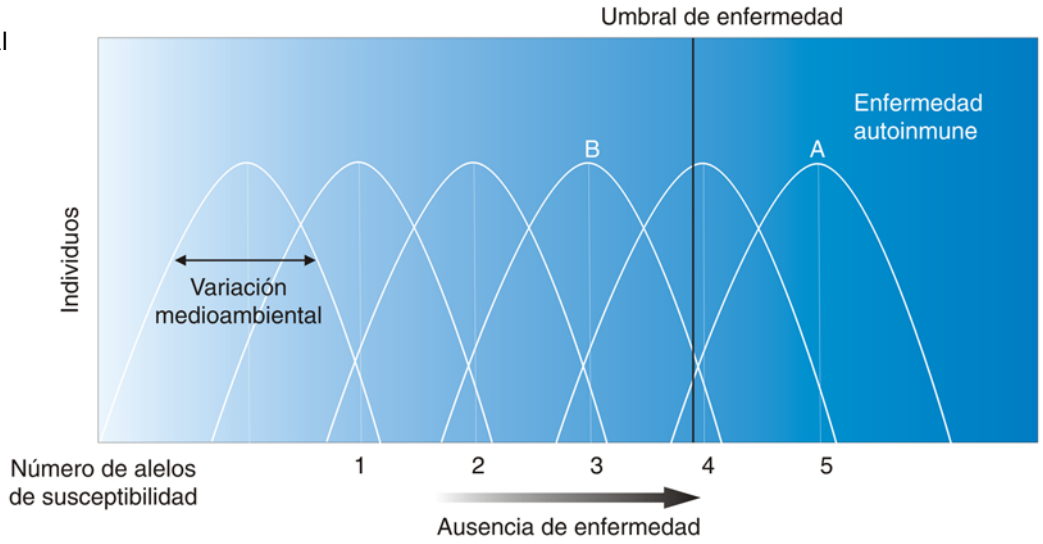
Algunos autores han utilizado este modelo de umbral para explicar el inicio de las EAI. De acuerdo con éste, individuos que son portadores de múltiples genes de susceptibilidad, sin genes de resistencia o genes modificadores, tienen una predisposición a enfermar y se encuentran muy cerca al valor del umbral o exceden ese valor y, por lo tanto, padecen alguna EAI. Por el contrario, individuos que no poseen o poseen pocos genes de susceptibilidad, se encuentran lejos del valor del umbral y, por lo tanto, permanecen sanos. De otra parte, individuos que tienen múltiples genes de susceptibilidad y que también son portadores de genes de resistencia y genes modificadores, tienen una alta predisposición genética, pero se encuentran a la izquierda del valor del umbral (Figura 1). La exposición a factores ambientales podría desplazar al individuo hacia el valor del umbral, así como también la interacción entre varios genes y la posibilidad de eventos no definidos o eventos estocásticos. Por lo tanto, los factores que pueden estar involucrados en el inicio de la enfermedad son múltiples, incluyendo la heterogeneidad

TABLA 1. Razón de prevalencia en enfermedades autoinmunes.

	Concordancia (%)				
Enfermedad	Gemelos Monocígotos	Gemelos Dicígotos	Familiares no-gemelos	Prevalencia en la población (%)	λ_R
DM1A	30-50	0-13	6	0.4	15
EM	25	0-5	3-5	0.1	20
LES	24-57	2-5	2-5	0.2	20-40
AR	12-15	3-4	2-4	0.24-1.0	5-10

DM1A: Diabetes Mellitus autoinmune, EM: Esclerosis Múltiple, LES: Lupus Eritematoso Sistémico, AR: Artritis Reumatoide.
Tomado de ref. 3

FIGURA 1.
Modelo de umbral de enfermedad.



genética entre y dentro de la población que tiene dicha enfermedad (5).

La causa de las enfermedades complejas, como las EAI, no es única. Consiste en una sumatoria de factores, que pueden ser genéticos y ambientales, ninguno de los cuales es capaz de desencadenar la enfermedad por sí solo. El modelo que se acaba de describir tiene dos dificultades importantes cuando se aplica a las EAI. Primero, el valor de umbral divide una población en dos grupos distintos. Por definición, los ubicados a la derecha del valor de umbral están afectados y los ubicados a la izquierda están sanos. Sin embargo, el diagnóstico de las EAI se basa en la combinación de criterios clínicos, de laboratorio y, algunas veces, de imágenes; y sólo pasan el umbral aquellos individuos que cumplan con los criterios que definen cada EAI. Por lo mismo, el umbral no divide al grupo de EAI en sano y enfermos, sino en un grupo que reúne los criterios de diagnóstico para una EAI particular (Individuo A en la Figura 1), y un segundo grupo de individuos que poseen algunos criterios pero sin la suficiente predisposición para alcanzar dicho umbral (Individuo B en la Figura 1). En consecuencia, el umbral en las EAI es un punto arbitrario. En efecto, las EAI pueden tener etapas infraclínicas, y formas incompletas o frustras. De otra parte, es importante resaltar que manifestaciones clínicas de enfermedades no-autoinmunes pueden simular fenotipos de EAI. Esto es denominado fenocopia. Tal es el caso de los síntomas secos que simulan el síndrome de Sjögren (SS), el cual se caracteriza por resequedad de mucosas como consecuencia de una respuesta autoinmune inflamatoria contra las glándulas exocrinas. No todos los pacientes que presentan síntomas secos padecen de SS (Capítulo 24). Otro ejemplo corresponde a los individuos que presentan artralgias como único síntoma y anticuerpos antinucleares en el suero, en bajas diluciones. Sería erróneo diagnosticarlos como pacientes con LES. Esto resalta la importancia de clasificar correctamente los pacientes que son investigados en los estudios genéticos. En algunos casos, sobre todo para EAI sistémicas se recomienda estratificarlos (separarlos) por criterios comunes para todos. Así, el umbral (cumplimiento de criterios) se puede modificar y, en algunos casos considerarse un continuo, cuyo valor puede cambiar en la medida en que se modifican los criterios diagnósticos.

La segunda dificultad del modelo tiene que ver con el carácter determinista del valor del umbral, el cual no se aplica a las EAI, dado que los eventos estocásticos participan en el desarrollo de éstas con igual importancia que los factores genéticos y ambientales. Si no fuese así, y los eventos estocásticos tuvieran una mínima contribución, la tasa de concordancia entre gemelos debería ser mayor. Por lo tanto, se considera que los eventos estocásticos influyen en la penetrancia de genes de susceptibilidad a las EAI (6).

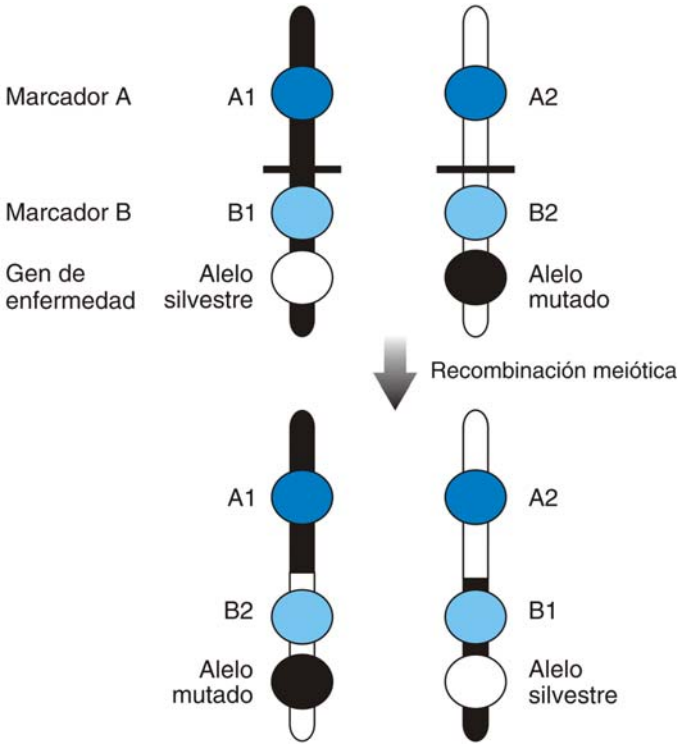
La pregunta que surge es cómo identificar el mecanismo genético involucrado en la génesis de las EAI. Para ello se han desarrollado varios métodos, descritos a continuación, que se apoyan en técnicas de biología molecular, bioinformática y algoritmos estadísticos complejos

Estudio de ligamiento

Éste es un recurso valioso para identificar genes de susceptibilidad. El análisis de ligamiento permite localizar loci que contienen genes que influyen sobre la variabilidad del fenotipo, y que pueden tener asociación causal con éste. Esto se explica porque los loci se transmiten juntos más de lo esperado por el azar durante la meiosis (Figura 2). Cada uno de estos locus se conoce como QTL. Un QTL puede explicar sólo una pequeña proporción de la variabilidad observada en un fenotipo, mientras que el resto se deberá a otros QTLs y a los factores ambientales.

El primer paso para detectar ligamiento entre un locus y un fenotipo, es generar un mapa cromosómico utilizando marcadores genéticos en las familias estudiadas (diferente a los estudios de asociación, en donde se parte de casos y controles) (Tabla 2). Para que el análisis sea robusto y con alto poder estadístico hay que usar una serie de marcadores altamente informativos separados unifor-

FIGURA 2.
Principio de ligamiento.
Durante meiosis, cuando los cromosomas homólogos se aparean, se rompen en los puntos idénticos a lo largo de su longitud, dando lugar a un intercambio de los segmentos idénticos del cromosoma entre dos cromosomas homólogos. El principio del análisis de ligamiento se basa en el hecho de que sí un marcador (B) está cerca de un gen de susceptibilidad, segregarán juntos durante la recombinación, mientras que sí un marcador (A) que está lejos del gen no se cosegregará con él. En el ejemplo mostrado, el marcador B se liga al gen de la enfermedad, y dentro de una familia determinada un alelo del marcador B (B2 en este ejemplo) será visto con mayor frecuencia que lo esperado por el azar en los individuos afectados (es decir, los que heredan el alelo mutado del gen). Cuanto más cercano el marcador se encuentre del gen relacionado con la enfermedad, más fuerte será el ligamiento con la enfermedad (WT: alelo salvaje o silvestre).



memente a lo largo de los cromosomas, usualmente cada 20 centimorgans (cM), en todos los sujetos de las familias a estudiar. Se considera que un marcador es altamente informativo cuando es muy polimórfico y es poco probable encontrar individuos con los dos alelos iguales (homocigotos). Si los 2 alelos son distintos (heterocigotos) en la mayoría de sujetos de una familia, se puede seguir con facilidad la herencia de cada uno de ellos a lo largo de generaciones sucesivas. Como consecuencia, se puede determinar cuántos alelos idénticos comparten 2 individuos concretos de la familia (las posibilidades son 0, 1 ó 2). Los marcadores genéticos más utilizados en la búsqueda de ligamiento son polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y microsatélites.

El concepto estadístico de *ligamiento* entre un fenotipo y un marcador genético puede ser resumido de la siguiente manera: si el fenotipo ocurre en individuos que comparten más alelos, es decir, que genéticamente son similares para un marcador determinado (STR u otro), se infiere que el locus que contiene este marcador está ligado al fenotipo. Esto implica que en la proximidad del marcador existe un gen que influye en el fenotipo. De manera estricta el ligamiento se produce entre el marcador y el gen, aunque se acepta que el fenotipo sea el que está "ligado" al marcador. Los estudios de ligamiento permiten estudiar la cosegregación y establecen relaciones de causalidad; además, pueden detectar genes desconocidos involucrados en la enfermedad (7).

El ligamiento entre dos loci no es un fenómeno en sí, sino una hipótesis que debe demostrarse con una prueba estadística. Para ello se utiliza el método de máxima verosimilitud. Para obtener un valor de significancia estadística, se transforma logarítmicamente el cociente de verosimilitud en lo que se denomina *LOD score* (logaritmo del cociente de verosimilitud del ligamiento):

$$\text{LOD} = \log_{10} \frac{\text{Probabilidad de que ambos loci estén ligados}}{\text{Probabilidad de coligamiento}}$$

TABLA 2. **Principales diferencias entre estudios de ligamiento y de asociación genética.**

Estudios de ligamiento	Estudios de asociación
Prueba en familias para la cosegregación del marcador de la enfermedad	Prueba en la población para la cosegregación del marcador de la enfermedad
Los resultados significativos indican ligamiento físico entre el marcador y los loci candidatos	Los resultados significativos indican ligamiento físico con desequilibrio de ligamiento entre el marcador y el locus candidato (debe excluir otras causas de asociación como estratificación de la población)
Necesita datos familiares con mínimo dos hijos afectados (con o sin padres)	Se usa la población (casos y controles) o datos familiares. Los datos familiares evitan tener efectos por la poca estratificación de la población. Además, sólo necesita un hijo afectado
Puede detectar ligamiento inclusive cuando el marcador no está cercano al locus en estudio	Puede detectar un locus asociado sólo si está cercano al marcador y si existe desequilibrio de ligamiento entre ellos
Se necesitan pocos marcadores para búsquedas amplias del genoma	Necesita muchos marcadores para búsquedas amplias del genoma
Con menor poder de detección para alelos comunes en enfermedades diversas	Con mayor poder de detección para alelos comunes en enfermedades diversas

Tabla 3. Criterios de significación de Lander y Kruglyak.

Categoría	Rango de Valor de *P*	Rango de LOD *score*
No ligamiento	1.00-0.0008	0-2.1
Ligamiento sugestivo	0.0007-0.00003	2.2-3.5
Ligamiento significativo	0.00002-0.0000004	3.6-5.3
Ligamiento altamente significativo	≤0.000003	≥5.4
Ligamiento confirmado	Ligamiento significativo en un estudio inicial, y confirmado en una muestra independiente	

Lander y Kruglyak en 1995 (8) establecieron los criterios de significación de ligamiento para rasgos complejos, los cuales se muestran en el Tabla 3.

Los análisis de ligamiento son apropiados para generar mapas genéticos de baja resolución, dado que si se obtiene un resultado positivo usando marcadores separados cada 10 cM, se genera una región candidata de entre 20 a 30 cM alrededor de la señal de ligamiento genético. Si se considera que aproximadamente 1 cM corresponde a lo largo del genoma a 1 Megabase (Mb), o lo que es igual a 1.000.000 de pares de base (en términos de distancia física del genoma). En distancia genética 1 cM equivale al 1% de recombinación entre dos loci y la densidad de genes funcionales por Mb, una región de 20 cM podría contener más de 100 loci funcionales. Por lo tanto, la estrategia general para la identificación del gen funcional de interés (QTL) en una región tan amplia es saturarla con marcadores adicionales para obtener un mapa genético de alta resolución, utilizando marcadores espaciados entre 1 a 3 cM.

Una vez reducida la región candidata a 1-3 cM, el trabajo para identificar el gen o genes responsables de la variabilidad del fenotipo de interés es laborioso. A este nivel existen diferentes estrategias para continuar explorando la zona candidata, dependiendo si existe en esta región algún gen conocido susceptible de ser responsable del ligamiento con el fenotipo estudiando. Si existe un gen candidato, la vía de abordaje es el estudio de asociación genética (Tabla 2); de lo contrario se debe considerar explorar el desequilibrio de ligamiento (LD) en dicha región.

Desequilibrio de ligamiento

Cuando se estudia una población y se observa que no hay asociación entre el gen y un determinado marcador, se dice que los dos loci (el del gen y el del marcador) se encuentran en equilibrio de ligamiento, que es la situación normal. Sin embargo, en ocasiones si existe una asociación poblacional entre un gen y un marcador, entendiéndose por asociación que el marcador y el gen se den juntos con una frecuencia mayor de la esperada en función de las frecuencias individuales de cada unos de ellos. Esta situación se conoce como desequilibrio de ligamiento.

Para utilizar el análisis de desequilibrio de ligamiento se requiere de una población amplia de individuos afectados y no afectados, con el fin de crear mapas genéticos a niveles 10 veces mayores (0.1 cM) que los desarrollados en los estudios de ligamiento. Es decir, en este caso la búsqueda del gen candidato se reduce a regiones de aproximadamente 100-200 Kilobases (Kb), dado que el análisis de desequilibrio de ligamiento cuenta con un inmenso número de recombinaciones ocurridas durante muchas generaciones, lo que permite establecer mapas genéticos a intervalos menores, puesto que ha existido un número mayor de entrecruzamientos.

Una limitación de este modelo de estudio se da cuando son muchas las mutaciones causantes de la enfermedad en un determinado gen, ya que los cromosomas en diferentes individuos enfermos portarán diferentes alelos marcadores, lo que hará imposible identificar el desequilibrio de ligamiento entre el marcador y el fenotipo. Expresado de otra forma, el que no haya desequilibrio de ligamiento para un determinado marcador no excluye que la región estudiada albergue el gen candidato, mientras que, por el contrario, la ausencia de ligamiento si excluye que la región contenga el gen relacionado con el fenotipo en estudio (siempre y cuando se mantenga margen de error determinado por el tamaño de la muestra estudiada) (9).

Una forma de superar esta limitación es a través de la prueba propuesta por Spielman et al (10), conocida como prueba de desequilibrio de transmisión (TdT), la cual es una variante del análisis de desequilibrio de ligamiento que permite trabajar sólo con individuos enfermos (sin grupo control). Sin embargo, es necesario disponer de los padres del individuo afectado (Figura 3). Esta prueba com-

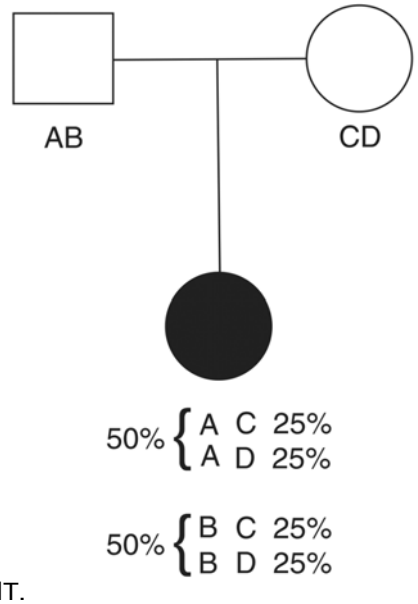


Figura 3.
Prueba de TdT.
En el pedigree, cada padre es heterocigoto para el marcador estudiado. Se espera que cada alelo tenga una probabilidad del 50% de ser transmitido de los padres a los hijos, y se espera que cada genotipo (combinación de alelos) tenga una probabilidad del 25% de ser transmitido de padre a hijos. Sí, en un gran número de pedigrees, el alelo A se encuentra con una frecuencia mayor al 50% entre los descendientes afectados (desequilibrio de transmisión), se considera que el alelo A está asociado con el gen mutado involucrado con la enfermedad estudiada.

para, en un amplio número de familias, el número de veces que uno de los padres transmite a su hijo un alelo específico con el número de veces que ese alelo no es transmitido. Bajo este marco conceptual, el TdT es un tipo de estudio de asociación en el cual el "caso" es el alelo transmitido y el "control" es el alelo no transmitido. Cuando hay número suficiente de familias se puede estudiar la significancia estadística de la transmisión frente a la no transmisión. Es decir, si ese alelo es trasmitido por los padres a los hijos (todos ellos afectados) más veces de las que sería previsible por el azar. Sí esto se logra probar, el alelo concreto tendría relación con la enfermedad.

Estudio de asociación

Los estudios de asociación genética buscan comparar las frecuencias de cada alelo del marcador polimórfico, o grupo de marcadores, en pacientes no relacionados (casos) y controles sanos para identificar marcadores que difieran significativamente entre los dos grupos. En la era postgenómica se han publicado gran cantidad de artículos en los cuales se reportan asociaciones con pocos marcadores polimórficos, pero muchos de ellos no han podido ser replicados (11). Los resultados positivos en los estudios de asociación pueden deberse a tres razones diferentes (12).

1. El alelo en cuestión es realmente causa del fenotipo.
2. El alelo no causa el fenotipo, pero está en desequilibrio de ligamiento con otro alelo que sí lo causa.
3. La asociación está dada por un artificio poblacional: estratificación de la población (ésta corresponde a una falsa asociación).

Así mismo, se debe recordar que el carácter complejo de las EAI implica que varios genes aportan efectos modestos sobre el fenotipo. La importancia relativa de los alelos sobre el desenlace y, por extensión, sobre la salud pública, es la Fracción Atribuible Poblacional (PAF), la cual corresponde a la fracción de la enfermedad que puede ser eliminada si el factor de riesgo es removido. Alelos de riesgo alto tienen un PAF > 50% en enfermedades mendelianas monogénicas. Tal no es el caso en enfermedades complejas en donde el PAF aproximado para *alelos raros* es menor del 10% (13). Luego, en enfermedades complejas como las EAI se debe procurar identificar *alelos comunes* con el fin de sumar los riesgos individuales y generar un PAF superior al dado por *alelos raros y específicos*. Este concepto se conoce como la hipótesis de variantes comunes/enfermedad múltiple (CV/MD) (Figura 4)(14), en la cual tres aspectos son fundamentales:

1. La identificación de variantes que puedan dilucidar nuevos e importantes aspectos en la patogénesis de la enfermedad.
2. Las variantes comunes puedan ser más importantes que una variante rara desde la perspectiva de la salud pública dado que tendrá un PAF mayor.
3. Variantes comunes de riesgo modesto son más fáciles para identificar que las variantes raras.

Los estudios de asociación genética son la mejor estrategia para el estudio de EAI, dado que la exposición (genotipo) puede ser medida después de iniciada la enfermedad sin error sistemático. El sesgo de selección de la muestra de casos o controles es menos serio que en los estudios de exposición a factores medioambientales, a menos que exista estratificación de la población y se puede obtener un número grande de muestra, en especial para aquellas patologías de presentación en la edad adulta. No obstante, los estudios de asociación no son fácilmente reproducibles. Las razones que explican esta inconsistencia en tales estudios son enunciadas a continuación (15).

Poder del estudio

La ausencia de suficiente poder estadístico para detectar el efecto [riesgo relativo genotípico u "odds ratio" (OR)] de un polimorfismo sobre el fenotipo es una causa obvia en la incapacidad de replicación de los hallazgos de los estudios de asociación, sobretodo porque el OR suele

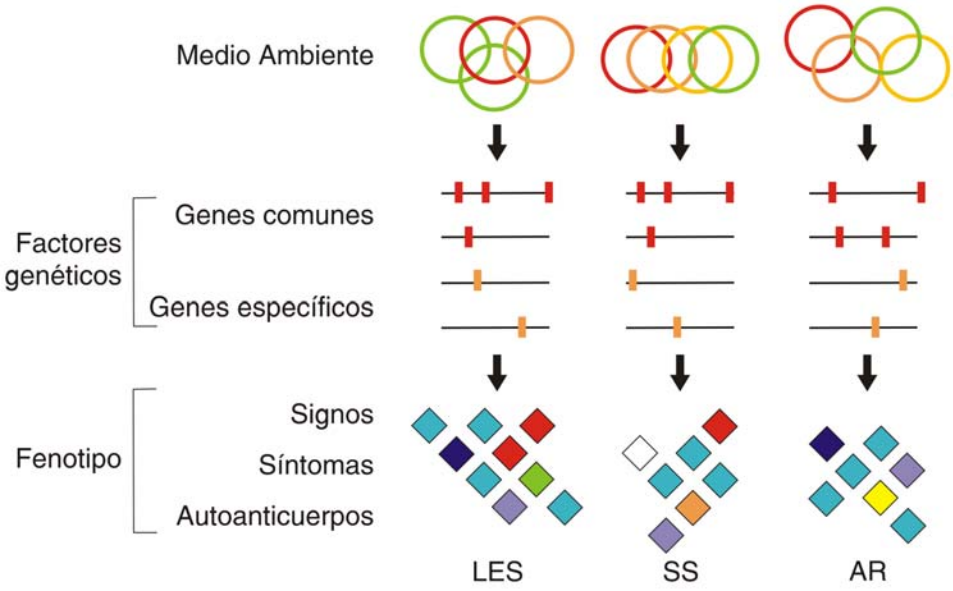


Figura 4.
Principios comunes para enfermedades diversas.
El fenotipo de las EAI varía en función de la influencia del medio ambiente sobre el genotipo. Existen genes comunes para varias de ellas, así como genes específicos.

ser pequeño en este tipo de estudios. Para enfermedades que tienen una agregación familiar modesta (razón de riesgo de recurrencia entre hermanos menor a 5), se puede inferir que pocos polimorfismos con efecto grande (OR > 2), o que muchos polimorfismos con efectos pequeños (OR < 1,5), estarían involucrados en la fisiopatología de la enfermedad (15).

Por lo tanto, el tamaño de la muestra es un aspecto de gran importancia para que los estudios de asociación genética sean confiables y reproducibles. Se plantea que estos estudios deberían manejar tamaños de muestras en el orden de "miles" para que tengan un poder adecuado de identificar polimorfismos que confieran OR entre 1.2 y 1.5, teniendo como base que la frecuencia poblacional del polimorfismo en estudio o alelo mutado se encuentre en el rango de 5 a 10% (16). De este modo estudios reportados con asociación negativa y con intervalos de confianza amplios podrían corresponder a falsos negativos con un efecto genético real no detectado en el estudio.

Estratificación de la población

Cuando los casos y los controles tienen diferencias en las frecuencias alélicas atribuibles a la diversidad étnica de la población y no al desenlace estudiado, se dice que en dicha población las diferencias son debidas a la estratificación de la población. En una población mezclada, cualquier fenotipo común a un grupo étnico resultará en una asociación positiva con cualquier alelo que también sea muy frecuente en ese grupo étnico, sin que el alelo tenga relación con el fenotipo. La asociación estaría originada por la coexistencia de diferentes poblaciones que tienen distinta frecuencia genética y diferente incidencia/prevalencia de la enfermedad. Por esta razón, el estudio en poblaciones genéticamente homogéneas permite evitar este tipo de falsas asociaciones (17).

Sin embargo, no siempre la población de interés es homogénea genéticamente; por tal razón, en los últimos años se han diseñado herramientas analíticas que no se ven afectadas por la estructura de la población de interés, una de ellas es la prueba TdT (10), ya mencionada, en la cual se evalúa la transmisión de alelos desde los padres heterocigotos hacia los hijos enfermos (Figura 3). De esta forma se estaría garantizando un estudio de casos y controles homogenizado o pareado por la mezcla genética, evitando que exista estratificación poblacional por etnia. En el TdT, al seleccionar la familia por medio del caso índice, la asociación entre el factor genético y enfermedad origina que en estas familias, la transmisión de alelos desde los padres heterocigotos (controles) hacia los hijos enfermos (casos) se aparta del valor esperado (probabilidad de transmisión del 50%). El padre heterocigoto (control) tendría la opción de transmitir a su hijo el alelo A o el alelo B, si ninguno de los alelos se encuentra relacionado con la enfermedad tanto A como B serán encontrados en igual proporción entre los hijos sanos o enfermos. Por el contrario, si el alelo A está asociado con la enfermedad, será encontrado con mayor frecuencia entre los hijos

Tabla 4. Combinación de alelos A y B transmitidos y no trasmitidos entre padres (2n) de casos afectados (n).

	Alelo no transmitido		
Alelo transmitido	A	B	Total
A	a	b	a + b
B	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	2n

enfermos (casos), con una probabilidad de transmisión superior al 50%. Para este tipo de prueba estadística, los padres homocigotos no aportan información al análisis. Para las situaciones donde no exista un número suficiente de padres heterocigotos se han diseñado métodos estadísticos exactos en los cuales se crean pseudocontroles a partir de los alelos paternos (18).

El diseño más usado y sencillo para la captación de la muestra ha sido el de familias tríadas, o trios (el individuo afectados y sus progenitores), pero también puede ampliarse a varios miembros afectados en la familia y sus progenitores. La hipótesis que pone a prueba el TdT es que el marcador y el fenotipo no están genéticamente asociados, y sólo son utilizadas las observaciones cuando los padres son heterocigotos (Tabla 4).

La fórmula $(b - c)^2 / (b + c)$ permite determinar si existe un número igual de transmisiones de A y B de padres heterocigotos a sus hijos afectados. Si existe ligamiento genético entre el marcador y el fenotipo, así como asociación alélica, b y c tenderán a ser diferentes. La prueba de significación estadística de TdT es el Chi cuadrado (X^2) (prueba asintótica de McNemar) o prueba binomial exacta (10). Una diferencia significativa confirma que el marcador está ligado al fenotipo. Cuando la prueba se aplica a las familias con fenotipo recurrente (más de un miembro afectado), la evaluación de que existe una asociación alélica no es válida. Esto se debe a que la prueba de X^2 supone que las observaciones son independientes, y ello no ocurre cuando los individuos participantes están emparentados; sin embargo, la prueba de ligamiento es válida en estas condiciones (10).

Modificación del efecto por otros factores genéticos o medioambientales

La heterogeneidad genética se refiere a la presencia de múltiples combinaciones de genes dentro del genoma que son capaces de causar un fenotipo similar o idéntico a la enfermedad. La heterogeneidad genética refleja que muchos genes participan en el desarrollo de fenotipos complejos y que diferentes combinaciones de variantes genéticas pueden llevar a desenlaces similares.

La verdadera heterogeneidad genética podría estar influyendo en los resultados contradictorios de los estudios de asociación. Aunque se debe tener en cuenta que la frecuencia de alelos comunes o haplotipos no parecen variar mucho entre poblaciones o grupos étnicos que se originan del mismo continente. Por lo tanto, la inconsis-

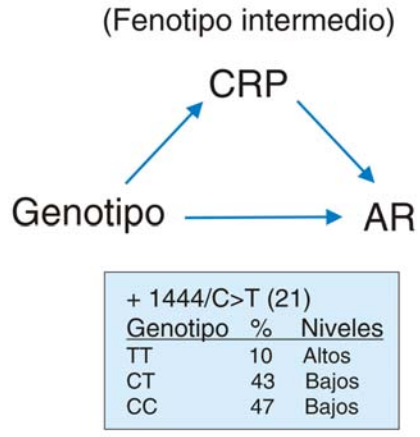
tencia entre estudios en poblaciones o grupos étnicos originados del mismo continente no parece ser atribuible a la interacción gen-gen. Al considerar la influencia de los factores medio ambientales y la forma como cada individuo, dependiendo de su composición genética, responde a éstos, es claro que la interacción gen-medio ambiente es una explicación posible para la imposibilidad de replicar estudios de asociación (15). Aunque se debe tener en cuenta que la existencia de una interacción entre el gen y el medio ambiente es, como tal, una asociación estadística, y no necesariamente causal. Sin embargo, es importante recalcar que las metodologías estadísticas que permiten detectar dicha interacción pueden proporcionar resultados interesantes que conlleven a plantear programas de prevención trabajando sobre estos factores de riesgo no convencionales.

Aleatorización mendeliana

Dado el gran número de polimorfismos que día a día son descritos, los estudios de asociación genética se están enfocando a trabajar con polimorfismos comunes que se expresen en sus fenotipos intermedios, es decir aquellos que son funcionales y, por lo tanto, producen cambios cualitativos o cuantitativos sobre la proteína que es codificada por el gen que se estudia. Así, una forma de proponer a un gen como candidato es cuando en los individuos con la enfermedad (casos) se observan variaciones cuantitativas o cualitativas de la proteína que es codificada por dicho gen (fenotipo intermedio) y que no son observadas en la población sana (control). Si bien se puede encontrar asociación entre la proteína alterada con la patología, es difícil establecer si esta asociación es causal o no y si ésta es debida a polimorfismos del gen que la codifica. La variación en la proteína puede corresponder a la influencia de otros factores de riesgo para la enfermedad que se estudia, por lo tanto existe la posibilidad que la asociación que se estudia entre el polimorfismo del gen y la enfermedad se deba a confusión o sesgo de causalidad reversa. Además, es importante recordar que los mecanismos de expresión génica involucran factores epigenéticos, postranscripcionales, postraduccionales (Capítulo 1).

Por otro lado, las variaciones de una proteína, expresada como niveles séricos, pueden verse influenciados por la expresión de otra proteína. Una diferenciación clara de los efectos que cada una de ellas tenga sobre la patología resulta aún más difícil debido al fenómeno conocido como colinealidad, el cual impide evaluar el efecto de una exposición [ej. niveles altos de Proteína C-Reactiva (CRP)], sobre un desenlace (ej. AR), mientras se ajusta por otra variable (ej. IL-6) (19). Una manera de ayudar a resolver este problema es mediante la realización de un ensayo clínico aleatorizado, utilizando una intervención selectiva que disminuya los niveles de CRP de manera exclusiva. Así, si los niveles elevados de CRP son causales esta intervención debe disminuir el riesgo de AR y ofrecer información no sesgada para establecer la verdadera asociación entre CRP y AR, independientemente de los niveles de la IL-6. Sin embargo, tal intervención selectiva no existe (20). Adicionalmente, eliminar la respuesta inflamatoria podría traer ciertos riesgos adicionales. Por lo tanto, la realización de un ensayo clínico para probar causalidad de la CRP e IL-6 en AR a la luz del conocimiento actual, es prácticamente imposible de llevar a cabo. Otra alternativa para eliminar en gran medida la posibilidad de confusión y sesgo de causalidad, para poder evaluar más claramente sí un factor de riesgo medio ambiental (ej. niveles elevados en plasma de CRP e IL-6) está asociado con una enfermedad (ej. AR), es por medio del estudio de las variantes genéticas (polimorfismos) que determinen de forma consistente los niveles del factor de riesgo a evaluar (ej. CRP e IL-6). Esto permitiría determinar sí estas variantes genéticas, polimorfismos o preferencialmente un grupo de polimorfismos, "haplotipo", se asocia con el riesgo de presentar AR (Figura 5).

FIGURA 5.
Estrategia de "Aleatorización Mendeliana".



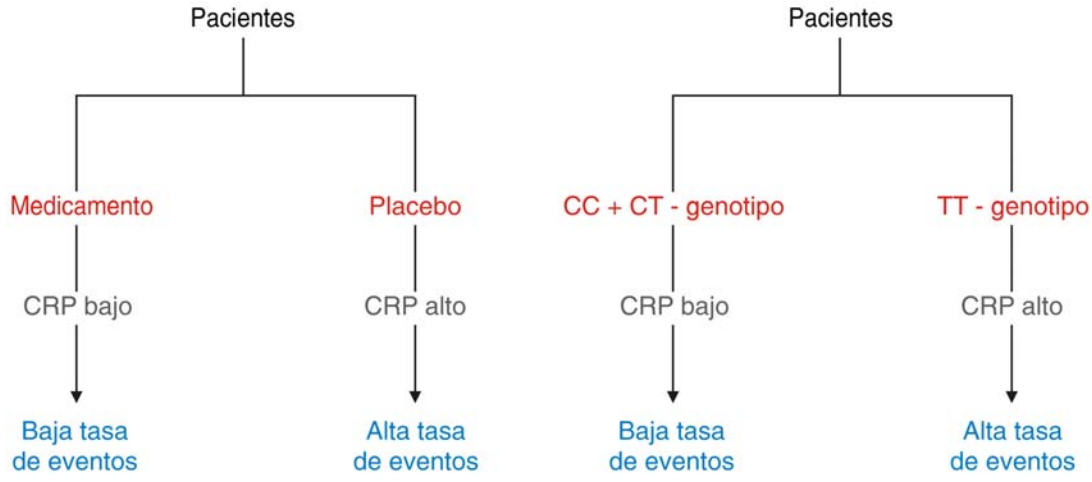
Si se establece la consistencia entre las siguientes asociaciones: primero, niveles séricos elevados de CRP e IL-6 como predictores de AR; segundo, polimorfismos o haplotipos en los genes de CRP e IL-6 con niveles séricos elevados de CRP e IL-6, respectivamente; y tercero, polimorfismos o haplotipos en los genes CRP e IL-6 con el riesgo de AR (Figura 5), se obtendría evidencia adicional, y sin sesgos de causalidad reversa, de un papel causal de la inflamación (de la CRP, IL-6 o ambos) en el riesgo de presentar AR. Esto es debido a la distribución al azar de los alelos de padre a hijo en el momento de la formación del gameto, explicado por la segunda ley de Mendel. Por lo tanto, aquellos factores que también se asocian con los niveles de CRP, y que actúan como factores de confusión en estudios observacionales, estarían distribuidos al azar de manera similar entre los distintos genotipos o haplotipos, característica que es bastante similar a un ensayo clínico aleatorizado (Figura 6). Un ejemplo más de esta aproximación, conocida como "Aleatorización Mendeliana" (22,23), corresponde al vínculo estudiado entre la homocisteina y las enfermedades cardiovasculares (24,25).

En conclusión, la identificación de variables alélicas funcionales en los genes candidatos constituye uno de los retos más importantes en la Genética Molecular del futuro, se trata de la denominada Genómica Funcional. Actualmente el proyecto Genoma Humano ya aporta un catálogo completo de los genes ubicados en cada región cromosómica de interés. Con esta información, la localización de los genes queda reducida a la evaluación sistemática de genes candidatos. Por lo tanto, aunque el análisis de los rasgos multifactoriales, en particular de las EAI, constituye un reto de alta complejidad en los ámbitos de la genética molecular y de la epidemiología genética, el desarrollo reciente de diferentes técnicas de estudio ofrece un panorama optimista. Los principales sitios de genética en español están indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Sitios de consulta sobre genética.

- Enfermedades genéticas / Genetic Disorders
  http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/geneticdisorders.html
- Glosario de Términos Genéticos (El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano)
  http://www.genome.gov/sglossary.cfm
- CDC Genómica y Prevención de Enfermedades
  http://www.cdc.gov/genomics/spanish/default.htm
- El Proyecto Biológico: recursos interactivos «online» para aprender biología
  http://www.biologia.arizona.edu/
- Biomodel: Complementos de Bioquímica y Biología Molecular
  http://www2.uah.es/biomodel/
- Asociación Española de Genética Humana
  http://www.uam.es/otros/AEGH/paginas/
- E-Bionet: Guías Interactivas De la Biología
  http://www.wantwit.com/Biol/espanol/index.html
- Proyecto Humano de la Diversidad del Genoma
  http://www.stanford.edu/group/morrinst/hgdp/protocolspanish.html
- Genoma Humano
  http://www.unam.mx/genoma/
- Institutos Nacionales de la Salud
  http://www.nih.gov/about/hispanic/

Figura 6.
Comparación entre un ensayo clínico y la aleatorización mendeliana



Glosario

Alelo silvestre o salvaje
Alelo que se encuentra con mayor frecuencia en la población, y que por tanto se designa arbitrariamente como «normal».

Asociación genética
La presencia de un alelo particular, en un grupo de pacientes, con una frecuencia significativamente más alta que la esperada por el azar.

Causalidad reversa
Confusión entre asociación estadística y causalidad, que puede llevar al error de concluir que el efecto de una causa es su causa.

CentiMorgan (cM)
Unidad usada para expresar distancias en un mapa genético. Es definido como la longitud de un intervalo en el cual hay un 1% de probabilidad de recombinación. En la práctica un cM es equivalente a un Megabase de DNA. Se representa por la letra griega δ.

Colinealidad
Problema en los análisis de regresión, que ocurre cuando una variable independiente es combinación lineal de otras, haciendo al modelo irresoluble. Cuando una variable es combinación lineal de otra, significa que ambas están relacionadas, por lo tanto el coeficiente de correlación entre ambas variables es 1.

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)
Región cromosómica ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p), que posee 3.5 megabases con aproximadamente 130 genes expresados, de los cuales el 40% están relacionados con múltiples funciones del sistema inmune.

Concordancia
Grado de similaridad o identidad que existe para un carácter fenotípico determinado entre gemelos.

Distancia genética
Distancia sobre un mapa genético, que se define por unidades de recombinación y que se miden en centiMorgans.

Distancia física
Distancia sobre un mapa físico, que se define por unidades en nucleótidos y se mide en pares de bases (pb).

Desequilibrio de enlace o de ligamiento (LD)
Es la asociación preferencial de dos alelos en una población, que sucede más frecuentemente de lo esperado por el azar. El DL es detectado por estadística e implica que los dos alelos están muy cercanos, por lo tanto no se recombinan y se heredan en bloque.

Determinismo
Principio que sostiene que todo lo que ha habido, hay y habrá, así como todo lo que ha sucedido, sucede y sucederá, está fijado y establecido de antemano, y que no puede suceder nada sin estar previamente fijado, condicionado o establecido.

Enfermedad compleja
Enfermedades que son el resultado de la participación combinada de factores genéticos heredables y de componentes no genéticos originados en el medio ambiente. Cada uno de los componentes tiene un efecto aditivo pequeño sobre el desarrollo de tales enfermedades. Su patrón de herencia no es explicable por las leyes de Mendel.

Estratificación de la población
Presencia de varios subgrupos con diferentes frecuencias alélicas en una población. La presencia de estos subgrupos puede ser independiente de la enfermedad y puede generar conclusiones erróneas, como desequilibrio de ligamiento.

Eventos estocásticos
Evento que se da al azar.

Fenocopia
Rasgo fenotípico que se induce por factores no genéticos, pero que reproduce el fenotipo producido habitualmente por un determinado genotipo. Este rasgo ni se ha heredado ni se transmitirá a las siguientes generaciones.

Fenotipo
Conjunto de características observables de un organismo o grupo, fruto de la interacción entre su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

Gemelos dicigotos
Gemelos fraternos, se deben a fecundaciones separadas, por lo tanto tienen la mitad de sus genes en común.

Gemelos monocigotos
Gemelos idénticos desde el punto de vista genético, ya que comparten todos sus alelos.

Genes candidatos
Gen al que se hace responsable de una enfermedad, tanto por la posición que ocupa en el mapa genómico (candidato posicional), como por las propiedades de la proteína que codifica (candidato funcional)

Genotipo
Conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus locus.

Haplotipo
Combinación particular de alelos en una región definida de un cromosoma.

Heredabilidad
Proporción de la variación fenotípica que es debida a la variación genética total. Da una idea del grado en que un carácter fenotípico está determinado genéticamente

Herencia multifactorial
Patrón de herencia de los rasgos fenotípicos que están determinados a la vez por factores genéticos (a menudo por varios genes) y por factores ambientales.

Heterocigoto
Individuo diploide con alelos diferentes en uno o más locus de cromosomas homólogos

Homocigoto
Individuo diploide con alelos idénticos en uno o más locus de cromosomas homólogos.

Ligamiento genético
Tendencia de dos o más marcadores genéticos a heredarse juntos en una proporción mayor a la explicada por el principio de distribución independiente que aumenta con su proximidad al reducirse la probabilidad de ser separados durante una reparación del DNA o los procesos de replicación.

Locus (plural-Loci)
Posición que ocupa un gen en el genoma.

Marcadores polimórficos
Una clase de DNA el cual es comúnmente utilizado en estudios genéticos ya que son útiles por el grado de polimorfismo tan alto que poseen.

Microsatélite
Secuencia pequeña, aproximadamente de 100 pb, de repeticiones en tándem por lo general de 1-4 pares de bases, por ejemplo $(CA)_n$. Frecuentemente son polimórficos y fueron la primera herramienta genética para estudios de mapeo. Algunas veces son denominados STRs (simple tandem repeat) o SSR (simple sequence repeat).

Penetrancia
Proporción de individuos portadores de un genotipo que muestran el fenotipo esperado, en unas condiciones ambientales concretas. Es decir la relación entre el número de individuos que presentan una enfermedad con el número de individuos que deberían presentarla conforme a su genotipo.

Polimorfismo
Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual a 1% (0,01) en la población general. Un polimorfismo puede ser transitorio (las frecuencias alélicas tienden a cambiar debido a una ventaja selectiva) o estable (las frecuencias alélicas permanecen constantes durante muchas generaciones).

Polimorfismo nucleotídico simple (SNP)
Es un polimorfismo en el DNA que involucra un cambio de un solo nucleótido por otro. Se cree que en el genoma humano existen diez millones de SNPs.

Poder estadístico
Característica de una prueba de hipótesis estadística, que denota la probabilidad de que la hipótesis nula sea rechazada si realmente es falsa. Es igual a 1 menos la probabilidad de que haya error de tipo II. El poder de resolución es la comparación de las mediciones individuales.

Prueba TdT
Prueba para determinar evidencia tanto de ligamiento como de asociación con ayuda del desequilibrio de ligamiento, en tripletas de padres, madres e hijos afectados.

QTL
Locus importante en la determinación del fenotipo de un carácter continuo o cuantitativo.

Sesgo de selección
Error debido a diferencias sistemáticas entre las características de los seleccionados para el estudio y las de los que no se seleccionaron. Esto da lugar a una distorsión sistemática del Odds Ratio.

Robusto
Prueba o procedimiento estadístico que es muy sensibles a las desviaciones de las presunciones sobre las cuales está estrictamente construido (p. ej., que los datos se distribuyen normalmente).

Umbral
Nivel límite de predisposición.

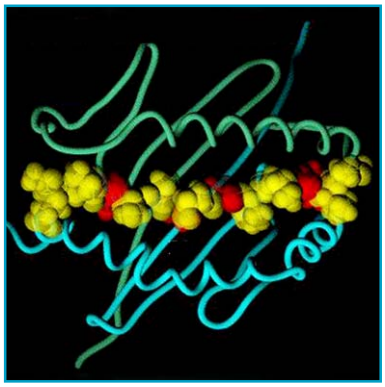
Referencias

1. Susser M. Separating heredity and environment. Am J Previ Med 1985: 1:5-23
2. Ollier WER, MacGregor A. Genetic epidemiology of rheumatoid disease. Br Med Bull 1995;51:267-85
3. Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. Nature Immunol 2001;2:802-9
4. Elston RC. Segregation analysis. Adv Hum Genet 1981;11:63-120.
5. Wyszynski DF. Genetic epidemiology: an expanding scientific discipline. Rev Pan Am J Public Health 1998;3:26-34
6. Haegert DG. Analysis of threshold liability model provides new understanding of causation in autoimmune diseases. Medical Hypotheses 2004;63:257-61
7. Members of the Complex Trait Consortium. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. Nature 2003; 4:911-6
8. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nature Genet 1995; 11:241-7
9. Reich DE, Cargill M, Bolk S. Linkage disequilibrium in the human genome. Nature 2001;411:199-204
10. Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission disequilibrium test. Am J Hum Genet 1998;62:450-8
11. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. Nature Genet 2003;33:177-82
12. Lander Es, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. Science 1994;265:2037-48
13. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L et al. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. Nature 2004;429:446-52
14. Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. Med Hypotheses 2004;62:309-17
15. Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. Lancet 2003;361:865-72
16. Ioannides JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. Lancet 2003;361:567-71
17. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. Lancet 2003;361:598-604
18. Cleves MA, Olson JM, Jakobs KB. Exact transmission disequilibrium test with multiallelic markers. Genet Epidemiol 1997;14:337-47
19. Szklo M, Nieto FJ. Epidemiology: Beyond the basics. Maryland, Aspen 2000:177-210
20. Pepys M, Hirschfield G. C-reactive protein: a critical update. J Clin Invest 2003; 111:1805-12
21. Brull DJ, Serrano N, Zito F et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:2063-9
22. Davey Smith G, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? Int J Epidemiol 2003;32:1-22
23. Davey Smith G, Ebrahim S. Mendelian randomiation: prospects, potentials and limitations. Int J Epidemiol 2004;33:30-42
24. Klerk M, Verhoef P, Clarke R et al. MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C—>T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. JAMA 2002;288:2023-31
25. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. BMJ 2002; 325: 1202

18

MECANISMOS MOLECULARES DE ASOCIACIÓN DEL HLA CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Paula A. Correa
Luis Miguel Gómez
John Castiblanco
Juan-Manuel Anaya



Contenido

Análisis epidemiológico
Interacción molecular, péptidos-MHC y EAI
- Artritis reumatoidea
- Esclerosis múltiple
- Espondilitis anquilosante
- Lupus eritematoso sistémico
- Diabetes miellitus autoinmune tipo 1
- Síndrome de Sjögren

Haplotipos ancestrales en la asociación molecular del MHC con las EAI

Las enfermedades autoinmunes son patologías complejas, multifactoriales, en las que se expresa claramente un componente ambiental y genético, asociado a la susceptibilidad o protección para desarrollarlas. En este capítulo se discutirán parte de los factores genéticos asociados a ellas, sobre todo la asociación con los diferentes alelos del MHC, en especial el HLA clase I y clase II, así como el papel molecular de las proteínas codificadas por estos alelos en dicha asociación.

Introducción

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son patologías inflamatorias crónicas de carácter complejo. Son consideradas órgano específicas o sistémicas, que se caracterizan por inducir respuestas inmunes bien sean de tipo humoral (linfocito B) o celular (linfocitos T). En estas patologías, aunque su etiología es desconocida, es bien sabido que tienen componentes ambientales y poligénicos involucrados en su susceptibilidad y/o protección. La suma de los genes involucrados en estas patologías conforma el componente genético que las identifica. Este patrón se puede definir como herencia compleja ya que no sigue los estándares mendelianos clásicos. Además, estudios hechos en gemelos monocígotos y dicígotos han permitido estimar la contribución relativa de los efectos genéticos como se puede observar en la Tabla 1.(1-8) Dentro de los factores genéticos que tienen mayor relevancia en las EAI se encuentran los genes ubicados en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en particular las regiones clase I y clase II conformadas por los loci HLA. Una extensa lista de EAI se han asociados con diferentes variantes de los genes HLA, en particular de clase II (Tabla 2) (9,10). No obstante, el tipo de alelos asociados a las diversas patologías pueden variar de una población a otra, y una misma población puede presentar diferentes alelos asociados. Además los loci HLA también pueden estar involucrados en la modificación de las variables medio ambientales asociadas con las EAI.

El mapeo genético de la región MHC ha identificado múltiples genes que codifican para las regiones MHC clase I y clase II o regiones HLA y para otros cientos que son loci no HLA, como se ve en el Capítulo 12. Los recientes avances en las técnicas moleculares, basados en la secuencia y conformación de los diferentes epítopes de las moléculas HLA y de los genes que los codifican, han permitido desarrollar análisis moleculares y funcionales que, junto con la epidemiología genética y molecular, permiten establecer, por lo menos, hipótesis de los mecanismos de asociación entre el HLA y la fisiopatología de enfermedades tales como la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la diabetes miellitus tipo 1 autoinmune (DMT1A), la espondilitis anquilosante (EA), la esclerosis múltiple (EM) y el síndrome de Sjögren (SS), entre otros. Sin embargo, los mecanismos moleculares de asociación con estas enfermedades no están del todo resueltos. La dificultad en la identificación entre los genes de asociación primaria y secundaria, así como el complicado desequilibrio de ligamiento que existe entre los genes del MHC, sumados a la interacción de estas moléculas con agentes infecciosos o alergenos, ha dificultado el esclarecimiento de estas hipótesis.

Para el planteamiento de las hipótesis de asociación, se partió de que las asociaciones del sistema MHC con las EAI pueden resultar de la combinación de varias moléculas codificadas por varios loci HLA (clase I y/o clase II) o no HLA (TAP1 y TAP2) (10), con diferentes funciones en la respuesta inmune y en el procesamiento y presentación de los antígenos (11) y, por tanto, en la selección entre lo propio y lo no propio, y la activación de los linfocitos T autorreactivos (10,11). De igual manera, se ha pensado que las secuencias de los péptidos generados a

Tabla 2. Alelos HLA asociados con las diferentes enfermedades autoinmunes.

Enfermedad autoinmune	Alelos HLA asociados
Enfermedad de Adison	DRB1*0404
Hepatitis Autoinmune	DRB1*1302 (Latino América), *0301-*0401 (Caucásicos)
Hipotiroidismo autoinmune	DRB1*0301
Enfermedad celíaca	DQB1*0201, DQB1*0302
Síndrome de Berilium crónico	DPB1*0201
Artritis de Lyme	DRB1*04 Y DRB1*1501
Cardiomiopatía dilatada familiar	DRB1*04
Síndrome Goodpasune	DRB1*15
Enfermedad de Giave	DRB1*0301
Síndrome de insulinitis autoinmune	DRB1*0406
Diabetes miellitus tipo 1 autoinmune	DRB1*04, DQB1*0302
Dermatomiositis	DQA1*0501
Miastenia Gravis Lambert-Eaton	DRB1*0301-DQB1*0201
Esclerosis múltiple	DRB1*04- DRB1*1501
Miastenia Gravis	DRB1*0301
Artritis reumatoide juvenil	DRB1*0801, DRB1*11
Penfigus foliaceo	DRB1*0404, DRB1*14
Penfigus vulgaris	DRB1*0402
Lupus eritematoso sistémico	DRB1*0301
Escleroderma	DRB1*11
Síndrome de Sjögren	DRB1*0301-DQB1*0201
Artritis reumatoide	DRB1*04 + ER

ER: Epítope reumatoideo. Adaptada de Gebe JA Tissue Antigen 2002.

Tabla 1. Concordancia de monocigotos y dicigotos para enfermedades autoinmunes.

EAI	Concordancia para monocígotos (%)	Concordancia para dicígotos (%)	Lod Scored λ	Referencias
AR	15,4	3,6	5-10	Silman et al. 1993. Ollier et al. 1997
LES	25	0	20	Grennan et al. 1997. Vyse et al. 1996
DMT1	50	6	ND	Barnett AH, et al. 1981
EA	75	13	46	Brown et al. 1997. Brown et al. 1998
EM	ND	ND	11-158	Englert et al. 1999.

partir de agentes infecciosos (virales o bacterianos), puedan ser muy similares a las de los péptidos generados a partir de proteínas propias, todos ellos presentados en el contexto de las moléculas HLA, lo cual puede generar una respuesta inmune similar, por "mimetismo molecular", a pesar de sus orígenes diferentes (12).

Análisis epidemiológicos

En la evaluación del papel de los alelos y las moléculas HLA en la susceptibilidad o protección frente a cualquier enfermedad, y en particular en las EAI, es de vital importancia la definición de la población que está en riesgo. Por tal motivo, el análisis epidemiológico convencional debe estudiar las variables de edad, sexo, etnia y procedencia geográfica, las cuales pueden elucidar múltiples factores ambientales asociados con estas patologías. De otro lado, estas variables deben ir apoyadas en la epidemiología molecular, que busca conocer la distribución genética de la población, sobre la cual se basan los estudios de asociación con HLA.

La epidemiología molecular parte del estudio de poblaciones homogéneas, con preferencia, grupos genética y geográficamente aislados, tales como las comunidades indígenas, que permiten identificar polimorfismos, nuevos alelos, nuevas secuencias, conocer haplotipos extendidos y determinar la expresión genética y funcional de las moléculas HLA en estas poblaciones. Además, la epidemiología molecular permite identificar el tipo de selección natural que está operando sobre la población y enmarcarla en un sistema, lo que genera datos tales como el equilibrio Hardy Weinberg, la deriva genética, la endogamia, la selección positiva a favor de ciertos alelos, o la selección negativa que presiona la desaparición de éstos (Caja 1) (13); todos estos factores pueden conducir a diferentes patrones de asociación con la enfermedad o al comportamiento funcional de la presentación antigénica y la respuesta inmunológica, afectada en patologías tales como las EAI.

Los estudios epidemiológicos generan datos de la representatividad de los fenotipos y los genotipos que conforman la población, por medio de las frecuencias alélicas, génicas y haplotípicas, que se traducen en efectos biológicos, como la susceptibilidad a enfermedades.

Caja 1.

Riesgo Relativo (RR)
Estimación de la intensidad de la asociación de un gen dado con la enfermedad. Indica cuantas veces más de riesgo tiene un individuo de desarrollar la enfermedad por ser portador de ese gen. RR>1 indica asociación, RR<1 indica protección.

Equilibrio Hardy-Weinberg
Es una distribución estabilizada de las frecuencias genotípicas en los valores p2, 2pq y q2, donde p y q son las frecuencias alélicas. Para que exista, se debe cumplir que la población sea de tamaño suficientemente grande, que haya apareamiento al azar y que no haya efectos de mutación, selección, migración o deriva.

Deriva genética
Corresponde a cambios en las frecuencias alélicas debidos a que los genes de la descendencia no constituyen una muestra al azar de los genes de los parentales. Puede ser causada por tamaño de la población demasiado pequeño.

Selección
Proceso por el cual un individuo con un genotipo determinado deja más descendencia que otro individuo con otro genotipo, debido a mejor supervivencia o fecundidad.

Interacción molecular: péptidos-MHC y EAI

Dadas las características de la interacción de péptidos con las moléculas MHC que se revisan en el Capítulo 12, es claro que muchos de los esfuerzos para explicar la asociación molecular de estos alelos con las EAI se enfoca en la identificación de autoantígenos y de las moléculas HLA que los presentan, como se revisará a continuación.

Artritis reumatoide

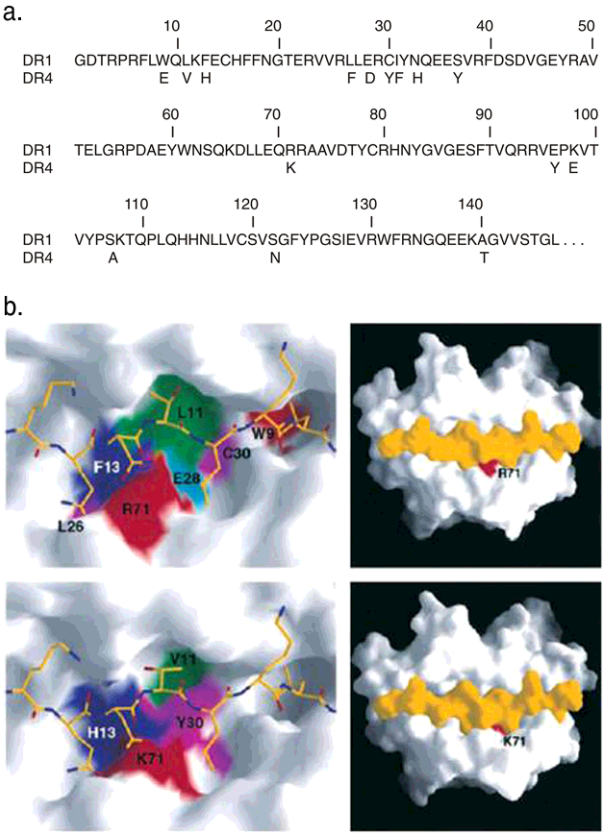
Los alelos HLA asociados con la AR en la población caucásica son el DRB1*0401 y *0404. En las poblaciones en las cuales los alelos DR4 son menos comunes, se ven otros alelos asociados, como el DRB1*0101, *1001 y *1402. Los mecanismos patogénicos de estos alelos no se han resuelto. No obstante, varios estudios se han hecho, con el ánimo de explicar la interacción alelo enfermedad.

Por ejemplo, el colágeno tipo II se propone como uno de los autoantígenos involucrados en la progresión de la AR, debido a que se observa en las articulaciones de pacientes con AR; análisis de estructuras cristalográficas de las moléculas HLA-DRA1*0101/DRB1*0401 en complejo con el péptido del colágeno CII 1168-1180 *QYMRAD QAAGGLR*, ha sido vista (14). En la secuencia del péptido interactúa un residuo de lisina (Lys), el cual encaja en el bolsillo P4 de la molécula HLA clase II, conformado por un residuo de ácido aspártico (Asp), cuya carga es negativa, que indica que el bolsillo P4 prefiere residuos cargados negativamente; de otra parte, también se ha observado que el bolsillo P1 de las moléculas HLA, que unen el péptido del colágeno, prefieren acomodar residuos hidrofóbicos en su interior (14). Estudios *in vitro*, utilizando ratones transgénicos sugieren que el péptido CII 261-273 (*AGFKGEQGPKGEP*), también derivado del colágeno, puede ser un mejor candidato como autoantígeno en la AR, ya que se han observado linfocitos T activados de forma específica, frente a este péptido, presentado en el contexto de las moléculas H2 del ratón. En humanos se ha podido establecer la interacción de este péptido con las moléculas HLA-DRB1*0404 y DRB1*0101, ambas asociadas con la AR. Sin embargo, es evidente que esta condición no es esencial para desarrollar la patología autoinmune (15).

Ya que la interacción de los péptidos con las moléculas HLA asociadas con la AR no explican del todo el mecanismo de asociación, se ha propuesto una segunda hi-

pótesis, en la cual se analiza que todos los alelos que han sido asociados, en las diferentes poblaciones con la AR, comparten la misma secuencia de aminoácidos (LLEQ[K/R]RAA) en las posiciones 67 a 74 de la cadena β de las moléculas HLA-DR. A esta región en particular se le ha denominado epítope reumatoide o compartido (ER) (Figura 1) (16). Se ha propuesto que todos los alelos que comparten este epítope inducen la activación de linfocitos T autorreactivos. Esta afirmación se complementa con estudios cristalográficos en los cuales se observa que una glutamina (Q) en la posición 70 y una arginina o lisina (R/K) en la posición 71 de la cadena β, establecen una interacción directa con el TCR, seleccionando una población específica de linfocitos T "reconocedores del ER" por lo que esta hipótesis indica que residuos diferentes a los del ER en las moléculas HLA clase II, son menos importantes en la AR. Así mismo, otros estudios han demostrado, a través de mutagénesis dirigida, que cambios en los residuos 70 al 74 de la cadena β, de los alelos que poseen el ER, pueden generar un cambio total en la gama de péptidos que son inicialmente presentados por estas moléculas (17). En el papel del ER no sólo son importantes los residuos que lo conforman y los péptidos que pueden unir sino también el desequilibrio de ligamiento que puedan tener los alelos que lo poseen, con otros loci, tanto HLA como no HLA (Figura 2), al igual que el patrón

FIGURA 1.
Residuos que conforman el epítope reumatoide y sus características cristalográficas.



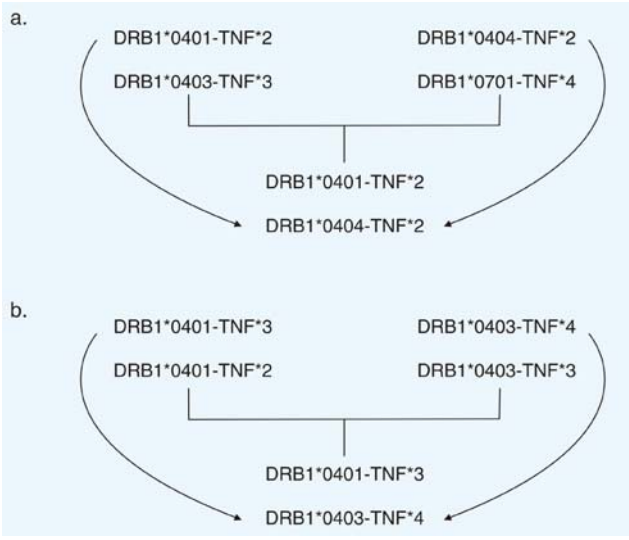


FIGURA 2.
Interacción de genes HLA y no-HLA asociados con enfermedades autoinmunes.
(Adaptada de Newton JL. et al. Genes and Immunity. 2004).

genotípico, es decir, si el individuo tiene un solo alelo positivo para el ER o si ambos alelos lo tienen, ya que la penetrancia varía, siendo baja para los individuos que tengan los alelos HLA-DRB1*04 en forma de homocigoto (> 50%) o heterocigoto (cercana a un 30%) o intermedia para los individuos que posean un alelo con el ER (35%-50%). Lo que permite concluir que el riesgo relativo (RR) puede ser alto con respecto a la presencia del ER, mas no suficiente para que la AR se presente en un 100% de los individuos que lo posean.

Esclerosis múltiple

Esta patología corresponde también a una EAI de predominio celular, caracterizada por la presencia de los linfocitos T autorreactivos, que reaccionan contra la proteína básica de la mielina (MBP), la glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos (MOG) y la proteína proteolipídica (PLP). La EM se ha asociado principalmente con alelos HLA de clase II, específicamente DRB1*1501; sin embargo, los alelos DRB5*0101 y DQB1*0602, también tienen su rol en la susceptibilidad genética a esta enfermedad, ya que están en desequilibrio de ligamiento con el DRB1*1501, el cual es considerado el alelo mayor de asociación. Así mismo se han reportado otros alelos asociados con la EM en diferentes poblaciones, entre ellos el DRB1*1303, DRB1*0301, DRB1*0401 y DRB1*0404 (18).

Estudios realizados tanto en el modelo animal de EM (encefalomielitis alérgica experimental [EAE]) como en modelos humanos, se han enfocado en el péptido MBP 84 -102, conocido como un epítope inmunodominante ENPV VHFFKNIVTPR, a partir del cual se han analizado cristalográficamente el complejo HLA DRB1*1501-péptido MBP; en este análisis , la característica más destacada corresponde a la capacidad del bolsillo P4 de la molécula

DRB1*1501 para unir residuos hidrofóbicos, debido a la presencia de una alanina (Ala), la cual recibe el residuo de fenilalanina (Phe) del péptido MBP (9, 19). Este P4 no sólo acomoda la Phe, sino que por su gran tamaño puede incorporar además residuos tales como Ala (aromático) y Lys, que interactúan perfectamente con la carga negativa de este bolsillo. No obstante, el papel del P4 y los residuos de anclaje, no son un requisito indispensable para desarrollar la enfermedad, por tanto se asume que hay otros factores adicionales, asociados o no al HLA que pueden desencadenar la patología.

Estudios posteriores de los linfocitos T de pacientes con EM, indican que hay múltiples clonas capaces de reaccionar contra la MBP y contra más de 10 determinantes de PLP, no obstante, la influencia de las moléculas HLA sobre la selección de esas clonas no se ha podido establecer (20). Además, se propone que los mecanismos que inducen la aparición de estos linfocitos pueden ser diferentes de los asociados con el inicio de la enfermedad.

Espondilitis anquilosante

La asociación de EAI con alelos HLA clase I es rara, excepto en esta enfermedad. El alelo HLA-B*27 ha sido reconocido en un 96% de los pacientes que padecen de EA (Capítulo 31). Es claro que no todos los alelos del B27 están asociados con la patología, por lo cual se han tratado de analizar las diferencias conformacionales de la cadena α en los residuos $\alpha 1$ y α primordialmente. La Lys en la posición 70 de la cadena α es un residuo común en toda la familia de B27; sin embargo, las combinaciones específicas de residuos polimórficos corresponden a His 9, Glu 45, Cys 67, Ala 71, todos ellos agrupados para conformar el bolsillo P2 (B) de la molécula, de tal manera que el Glu 45 y la Cys 67 se encuentran ubicados en la parte más profunda del P2 y reciben con mayor afinidad residuos de anclaje de péptidos que contengan Arg. Así mismo, la Lys 70 común a todas las B27, interactúa con el Asp 74; sin embargo, no parece ser crítico en la asociación con la EA, contrario a lo observado cuando la posición 74 posee una Tyr, propio del alelo B*2701, asociados con la EM. A pesar de que las asociaciones del B27 parecen ser estrictamente dependientes de la conformación de sus residuos, se plantea que los péptidos autoantigénicos deben tener un componente importante en la susceptibilidad y la fisiopatología de la EA; hasta el momento estos autoantígenos no han sido identificados, pero se conocen algunas características tales como la Arg en el residuo de anclaje para el P2 de la molécula, así como los aminoácidos con carga positiva en los bolsillos P1 y P9 de las moléculas de B27, o aminoácidos hidrofóbicos para el P3 (10, 21, 22).

Lupus eritematoso sistémico

Cerca de la mitad de los pacientes con LES, en las diferentes poblaciones, poseen asociación genética con alguna combinación de alelos HLA, cuya asociación termina siendo con haplotipos del MHC más que con alelos específicos. Este componente genético es analizado a fondo en el Capítulo 22. La asociación que presenta el LES en la mayoría de las poblaciones se da con el alelo HLA-DRB1*0301, que hace parte de una asociación común en EAIs. Dado que el LES es una patología sistémica, cuya alteración se encuentra en diferentes fases de la respuesta inmune, tanto humoral como celular, ha sido difícil establecer un posible autoantígeno, que permita elucidar la relación molecular entre el péptido y las moléculas HLA clase II asociadas con la enfermedad. No obstante, se presume que los patrones moleculares de dicha asociación cumplen parámetros semejantes a los planteados en otras patologías y que se vienen discutiendo en este Capítulo.

Diabetes miellitus autoinmune tipo 1

Varios alelos han sido asociados y ligados con la susceptibilidad a la DMT1 incluyendo HLADQB1*0302 y DQB1*0201 (5, 23). Se conoce que individuos que tienen ambos alelos tienen un mayor RR, comparado con la población general, de desarrollar la enfermedad. Igualmente, muchos alelos DRB1*04, los cuales están en desequilibrio de ligamiento con el alelo DQB1*0302, pueden modificar el RR para la enfermedad. En definitiva, la asociación HLA con DMT1 es una de las más complejas y estudiadas; en un principio se planteó que los alelos HLA-B8, HLA-B18 y HLA-B15 (B62) estaban incrementados en los pacientes con esta patología (24, 25). Luego, a medida que desarrollaron las pruebas moleculares, la asociación se expandió hacia los alelos HLADR3 (HLA-DRB1*0301), HLA-DR4 (HLA-DRB1*04), HLA-DQB1*0201 y HLA-DQB1*0302. A pesar de la cantidad de alelos de asociación encontrados para la DMT1 en los loci DR y DQ, se plantea que el locus o los loci de susceptibilidad para esta EAI no son claros, ya que los RR que ellos manejan son bajos, comparados con los haplotipos identificados como marcadores de susceptibilidad para la DMT1 (Tabla 3). Lo anterior puede ser explicado por la variedad de alelos existentes en el MHC, por las variaciones poblacionales y por el patrón de herencia de los alelos tanto de susceptibilidad como de protección tales como HLA-DRB1*1501 y/o DQB1*0602 (26-27)

Algunos estudios realizados en líneas celulares humanas de los linfocitos T, restringidas de acuerdo con los alelos DR y DQ, han reportado autoantígenos mayores asociados a la enfermedad, entre los cuales están la insulina, la glutamato descarboxilasa (GAD65) y los antígenos de la tirosina fosfatasa de los islotes del páncreas denominados IA-2. De forma similar, experimentos con ratones transgénicos HLA DQ0302 permitieron identificar la presencia de linfocitos T específicos para GAD (28), mientras que otros grupos sugieren que el péptido Ins B9.23, podría ser un autoantígeno inmunodominante de patrón restringido para el HLA-DQ (29).

Los estudios iniciales indicaban que la molécula DQ 0302 tenía preferencia por péptidos con carga negativa en el residuo de anclaje que se unía al bolsillo P9 (30), estas observaciones se soportaron con experimentos de unión

TABLA 3. Marcadores MHC asociados con diabetes miellitus tipo 1 autoinmune y sus riesgos relativos (RR).

HLA-A	RR	HLA-B	RR	Complotipo	RR	HLA-DR	RR	HLA-DRB1-DQB1	RR
A1	0.99	B7	0.52	SC31	0.53	DR1	0.90	DRB1*0301DQB1*0201	*3.55*
A2	1.36	B8	2.09	SC01	2.03	DR2	*0.16*	DRB1*04DQB1*0301	0.62
A3	1.05	B18	2.22	F1C30	*8.49*	DR3	3.55	DRB1*04DQB1*0302	*3.95*
A11	0.63	B50	1.0	SC33	3.10	DR4	2.91	DRB1*0101DQB1*0501	0.90
A24	1.58	B57	0.15	SB42	3.20	DR5	*0.24*	DQB1*0301	*0.36*
A26	1.53	B60	2.06	SC2	0.63	DR6	*0.46*	DQB1*0302	*3.95*
A28	*0.28*	B62	2.01	FC	0.82	DR7	*0.28*	DQB1*0602	*0.10*
A30	2.17	B65	0.68	S1C2	2.97	DR8	0.76	DQB1*0303	*0.23*
A33	*0.43*			SC61	*0.08*	DR9	0.72		

Adaptada de Larsen CE. Current opinion immunol 2004.

entre el péptido Ins B 9-23 y la molécula HLA DQ0302 (31). Péptidos con carga negativa en la misma posición podían formar un puente de unión entre una Arg y la molécula MHC, que ayuda a estabilizar el complejo, aumentando su vida media, contrario a lo observado con péptidos que no tuviesen la carga negativa. De otra parte, las moléculas HLA-DQ0302 tienen un P4 de gran tamaño, lo que les permite albergar residuos de péptidos hidrofóbicos, tales como la fenialanina (Phe) y la tirosina (Tyr), mientras que no puede aceptar residuos de carga positiva. El P1 de estas moléculas DQB1*0302, por su parte, es altamente polar, por tanto, puede contener residuos de carga positiva como la Histidina (His) y la Arginina (Arg). En la molécula correspondiente al alelo de protección también se ha podido establecer una característica molecular, la que consiste en que a diferencia del DQ0302, el DQ0602 prefiere los residuos alifáticos unidos al P9 (32). Así mismo, el residuo 57 de la cadena β de las moléculas DQ, también contribuye al patrón de péptidos unidos por estas moléculas; sin embargo, todos los estudios sugieren que es el P9 quién determina la selección de los péptidos autorreactivos involucrados en el desarrollo de la DMT1.

Síndrome de Sjögren

En individuos caucásicos, es una de las EAI asociadas al alelos HLA-DRB1*0301, igual a lo observado en el LES, esta asociación fue hallada de igual manera por nuestro grupo, en la población colombiana, cuyo componente genético corresponde a una población aislada con una fuerte influencia española y judía (33). De otro lado, el alelo DRB3*0101 se ha reportado asociado al SS, por el desequilibrio de ligamiento existente con los alelos DR3. Otros alelos tales como el DRB1*1101, y * 1104, *0405 y *0803 han sido asociados a la susceptibilidad al SS en otras poblaciones. Análisis moleculares del P4 de los alelos asociados al SS muestran que hay una carga positiva, dada por una Lys en la posición 71 y una Arg en la posición 74 de la cadena β que los conforma. Las características de los residuos de anclaje que se unen al P4 en estas moléculas también puede influenciar el patrón de reconocimiento del TCR, en linfocitos T autorreactivos. A pesar de que no se tiene un autoantígeno identificado en la susceptibilidad al SS, se presumen que los péptidos presentados por las moléculas HLA asociadas a esta EAI, pueden tener enlaces hidrofílicos en la posición 1 del péptido y residuos de carga negativa en la posición 4.

Haplotipos ancestrales en la asociación molecular del MHC con las EAI

Las secuencias de DNA conservadas como haplotipos extendidos o haplotipos ancestrales (HA), son una característica típica del MHC, gracias al fenómeno de desequilibrio de ligamiento que se observa entre loci y alelos. Se considera que cerca de un 30% de los haplotipos del MHC son haplotipos ancestrales en poblaciones como la caucásica (34). Los HA en el MHC son identificados por tener variantes alélicas idénticas en las regiones comprendidas entre el HLA-B, el complotipo y el HLA-DRB1. Algunos de estos HA son aceptados como marcadores de susceptibilidad para las EAI (35). La existencia de estos HA ha permitido establecer, que los alelos que los conforman, tales como el HLA-DRB1*0301 y *0401, no poseen un equilibrio Hardy-Weinberg, dado que hay un exceso de heterocigotos para estos alelos, lo anterior para tratar de compensar el hecho de que los HA disminuyen la variación de frecuencias de los alelos MHC en la población general si no se generara la ventaja heterocígota (36, 37).

La asociación de los HA con las EAIs se ha estudiado más en la población caucásica y se ha podido establecer que el HA 8.1 integrado por HLA A*01-Cw*07-B*08 en la región clase I y DRB1*0301-DRB3*0101-DQA1* 05011-DQB1*0201-DPA1*01-DPB1*0301-TAP1* 0101-TAP2*0201 en la región clase II, incluyendo el complotipo formado por los genes de la región clase III BF1-C2-C4A-TNF2. Este haplotipo es asociado con el LES, el SS y la DMT1. Funcionalmente se observa que los alelos HLA de clase II que forman parte de este HA, son los mismos que están en forma aislada como alelos de susceptibilidad para cada una de las EAI antes mencionadas. Además, estos alelos que forman parte del haplotipo extendido poseen características inmunológicas, muy definidas (Tabla 4), que pueden asociarse con la fisiopatología de las EAIs (35).

El otro HA asociado con EAI es el denominado 7.2, conformado por los alelos HLA A*0301-Cw*07-B*0702

en clase I, y DRB1*1501-DRB5*0101-DRB6*0201-DQA1*0102-DQB1*0602-DPA1*01-DPB1*0401 para clase II, incluyendo el complotipo para los genes del complemento y el TNF1. Este HA se asocia con la susceptibilidad al LES y la EM, aunque su importancia está en la asociación con enfermedades infecciosas, tales como la lepra y la tuberculosis y se maneja como protector en la DMT1 (38). A pesar de que su función molecular no es clara, se propone que este HA es un estimulador lento de la respuesta inmune innata y adquirida, ya que se observa una síntesis disminuida de los factores del complemento C4A y C4B, la síntesis de citoquinas y factores quimiotácticos es menos eficaz, lo que podría explicar en parte la susceptibilidad que confiere a las enfermedades infecciosas.

Muchos estudios son hechos para establecer el papel de estos HA. Luego de resolver la secuencia completa del DNA genómico, se plantea la existencia de otros seis HA dentro del MHC, que están siendo mapeados actualmente en el proyecto del MHC humano (http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/MHC/index.shtml); además de la caracterización de estos HA en diferentes razas y sus diferentes funciones (39), incluyendo los genes de la región clase III, cruciales para un mejor entendimiento de la asociación MHC-EAI.

Tabla 4. Características Inmunológicas del haplotipo ancestral 8.1.

Características	Efecto
Respuesta de células T	
Proliferación con mitógenos	Disminuye
Producción de IFN-γ, IL-2 e IL-2R	Disminuye
Expresión de CD69	Disminuye
Expresión de CD71	Normal
Número de células NK y linfocitos T	Normal
Actividad de las NK y las NKT	Disminuye
Producción de IL-4 e IL-6	Normal
Producción de IL-5	Disminuye
Función de macrófagos y citoquinas de fase aguda	
Formación de complejos inmunes formados por Fc y C3	Disminuye
Producción de TNF-α por leucocitos y células B	Incrementa
Bioactividad de la IL-1 en cultivo	Disminuye
Expresión de Fas y apoptosis espontánea	Incrementa
Expresión de Fas y apoptosis mediada por Fas	Disminuye
Producción de anticuerpos	
Títulos de autoanticuerpos	Incrementa
Respuesta tipo IgE a alergenos	Incrementa

Referencias

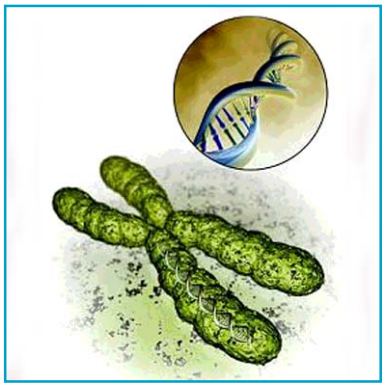
1. Silman AJ, MacGregor AJ,Thomson W, et al. Twin concordance rates for Rheumatoid artrhiris. Result from a nationwide satudy. Br J Rheumatol 1993; 32:903-907
2. Ollier W, Worthington J. Small fish in a big pond. Br J Rheumatol 1997; 36: 931-932
3. Grennan DM, Parfit A, Manolios N, et al. Family and twins studies in systemic lupus erythematosus. Dis Marker 1997; 13:93-98
4. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. Cell 1996; 85: 311-318
5. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, et al. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. Diabetology 1981; 20: 87-93
6. Brown MA, Kennedy MJ, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins. Arthritis Rheum 1997; 40: 1823-1828
7. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1998; 41: 588-595
8. Englert H, Small-McMahon J, Chambers P, et al. Familial risk estimation in systemic sclerosis. Aust N Z J Med 1999; 29: 36-41
9. Gebe JA, Swanson E, Kwok WW. HLA class II peptide-binding and autoimmunity. Tissue Antigen 2002; 59: 78-87
10. Urban RG, Chicz RM. MHC molecules, expression, Assembly and function. New York, NY. Chapman and Hall. 1996
11. Davison A, Diamond B. Autoimmune disease. N Engl J Med 2001;345: 340-350
12. Fourneau J-M, Bach J-M, van Endert PM, et al. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases Molecular Immunol 2004; 40: 1095–1102
13. Haines JL, Pericak-Vance MA. Overview of mapping common and genetically complex disease genes. En: Haines JL, Pericak-Vance MA editors. Gene mapping in complex human disease, 1a. ed. Canada: Wiley-Liss, 1998; 1-16
14. Dessen A, Lawrens CM, Cupo S, et al. X-ray crystal structure of HLA DR4 (DRA1*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. Immunity 1997; 7: 473-481
15. Fairchild PJ, Wraith DC. Lowering the tone: mechanisms of immunodominance among epítopes with low affinity for MHC Immunol Today 1996; 17: 80-85
16. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1987; 30: 1205-1213
17. Hammer J, Bono E, Gallazi F, et al. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based of peptide side chain scanning. J Exp Med 1994; 180: 2353-2358
18. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, et al. Multiple sclerosis: genomic rewards. J Neuroimmunol 2001; 113:171-184
19. Vogt AB, Kropshofer, Kalbacher H, et al. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. J Immunol 1994; 153: 1665-1673
20. Pelfrey CM, Rudick RA, Cotleur AC, et al. Quantification of self-recognition in multiple sclerosis by single-cell analysis of cytokines production. J Immunol 2000; 165:1641-1651
21. Buxton SE, Benjamin RJ, Clayberger C, et al. Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (HLA) class I molecules: analysis of the conserved B “45” pocket of HLA-B27. J Exp Med 1992; 175:809-819
22. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, et al. Identification on self peptides bound to purified HLA-B27. Nature 1991; 87 Suppl:S36-43
23. Wagener DK, Sack JM, LaPorte RE, et al. The Pittsburgh study of insulin-dependent diabetes mellitus: risk for diabetes among relatives of IDDM Diabetes 1982; 31: 1115-1118
24. Nerup J, Platz P, Ortved-Andersen O, et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. Lancet 1974; 2:864-866
25. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP. Insulin dependent diabetes mellitus. En Histocompatibility Testing 1980. Terasaki PL editor. Los Angeles UCLA Tissue Antigen Laboratory; 1981; 638-656
26. Erlich HA, Griffith RL, Bugawan TL, et al. Immplication of specific DQB1 alleles in genetic susceptibility and resistence by identification of IDDM siblings with a novel HLA-DQB1 allele and unusual DR2 and DR1 haplotypes. Diabetes 1991; 40:478-481
27. Pugliese A, Kawasaki E, Zeller M, et al. Sequence analysis of the diabetes-protective human leucocyte antigen-DQB1*0602 allele in unaffected, islet cell antibody-positive first degree relatives and in rare patients with type 1 diabetes. J Clin Endocrin Metab 1999; 84: 1722-1728

28. Herman AE, Tisch RM, Patel SD, et al. Determination of glutamic acid decarboxilase 65 peptides presentes by the type I diabetes associated HLA-DQ8 class II molecules identifies an immunogenic peptide motif. J Immunol 1999; 163: 6575-6582
29. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, et al. A disease-associated cellular immune response in type I diabetics to an immunodominant epitope of insulin. J Clin Invest 2001: 107: 173-180
30. Kwok WW, Domeier ME, Raymond FC, et al. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. J Immunol 1996; 156: 2171-2177
31. Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide HLA-DQ8 complex and susceptibility to type I diabetes. Nat Immunol 2001; 2: 501-507
32. Ettinger RA, Kwok WW. A peptide binding motif for HLA-DQA1*0102/DQB1*0602, the class II MHC molecule associated with dominant protection in insulin-dependent diabetes mellitus. J Immunol 1998; 160: 2365-2373
33. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD, et al. TAP, HLA-DQB1 and HLA-DRB1 polymorphisms in Colombian patients with primary Sjögren´s syndrome. Semin Arthritis Rheum 2002; 31:396-405
34. Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, et al. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragment or blocks. Tissue Antigens 2003; 62:1-20
35. Candore G, Lio D, Colonna-Romano G, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. Autoimmun Rev. 2002; 1: 29-35
36. Rotter JI, Anderson CE, Rubin R, et al. HLA genotype study of insulin-dependent diabetes the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. Diabetes 1983; 32: 169-174
37. Payami H, Thomson G, Motro U, et al The affected sib method. IV. Sib trios. Ann Hum Genet 1985; 49: 303-314
38. Dawkins, R, Leelayuwat C, Gaudieri S, et al. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. Immunol Rev 1999; 167: 275–304
39. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. Genome Res 2004; 14: 1176–1187

19

ASOCIACIÓN NO-HLA CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Norma C. Serrano
Carolina Páez
Paula Millán
Juan-Manuel Anaya



El patrón de herencia de las enfermedades autoinmunes (EAI) es complejo, indicando que múltiples genes se encuentran involucrados en su etiología. A pesar que genes del complejo mayor de histocompatibilidad, ubicado en 6p21.3, en particular aquellos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), han sido consistentemente implicados como factores de riesgo para las EAI, otros genes ubicados en la región MHC como fuera de ella confieren similar o mayor riesgo para estas enfermedades, tanto de manera específica como de forma común para algunas de ellas. En este capítulo se revisan los principales genes No-HLA involucrados en la susceptibilidad de las principales EAI, de acuerdo a su participación en la fisiopatología de éstas (mecanismo funcional o plausibilidad biológica).

Contenido

Lupus eritematoso sistémico
Artritis reumatoide
Esclerosis múltiple
Diabetes mellitus 1A
Enfermedades autoinmunes tiroideas

Introducción

El patrón de herencia de las enfermedades autoinmunes (EAI) es complejo, indicando que múltiples genes se encuentran involucrados en su etiología. No se puede desconocer el hecho que genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en particular del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), han sido consistentemente implicados como importantes factores de riesgo genético asociados a las EAI. Sin embargo, para ninguna de estas entidades la predisposición genética conferida por el HLA es suficiente para el desarrollo de las mismas, dado que son enfermedades complejas, en las cuales se requiere el concurso de varios genes y de factores medioambientales. En este Capítulo se revisan los principales genes No-HLA que confieren riesgo para las principales EAI (Tabla 1).

Tabla 1. Genes No-HLA involucrados en EAI.

Región Cromosómica	Gene (s) Candidato (s)
1q21-23	PCR FCGR IL-6R FasL IL-10
1q41-42	PARP
1p23	FNTR2
2q12	IL-1RA
2q13-21	IL-1 (IL-1α, IL-1β e IL-1RA)
2q33	CTLA4
2q35-37	PDCD1
5q31-33	IL-12
6p21.3	TNF, MOG
7q36.1	NOSe
10q23	Fas/APO-1 (CD95)
11q22	IL-18
12q12-14	VDR
12q24	IFN-γ, nNOS
16p11-12	IL-4R
17q11-12	NOSi
18q21-23	Bcl-2
19q13	MAG, APOE

Para una mejor comprensión del papel que juega cada uno de estos genes se han escogido como modelo de EAI al Lupus Eritematoso Sistémico (LES), a la Artritis Reumatoide (AR), a la Diabetes Mellitus Tipo 1A (DMT1A), a las Enfermedades Autoinmunes Tiroideas (EAT) y a la Esclerosis Múltiple (EM). Para cada una de ellas se ilustrarán los genes que han sido involucrados en las siguientes rutas fisiopatológicas:

1. Alteración de la inmunoregulación, autoreactividad y tolerancia.
2. Reacción inflamatoria: citoquinas y sus receptores.
3. Participación en la apoptosis.
4. Procesamiento antigénico y depuración de complejos inmunes.

Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

Esta enfermedad es considerada el prototipo de EAI sistémica, no específica de órgano, de origen multifactorial, en cuyo desarrollo interactúan factores genéticos y ambientales. El LES, como entidad compleja y heterogénea, y al igual que otras EAI, es poligénica, es decir, en su desarrollo están involucrados diversos genes que confieren susceptibilidad actuando conjuntamente bajo interacciones complejas, con penetrancia incompleta y sin seguir patrones de herencia mendeliana (1,2).

Estudios realizados en gemelos monocigotos reportan una concordancia del 24-65% y de sólo un 2-9% en dicigotos, hallazgo que sustenta una contribución genética fuerte. Esta diferencia de 10 veces entre la tasa de concordancia para los gemelos idénticos, sugiere que múltiples marcadores están involucrados en determinar la susceptibilidad genética a la enfermedad. El riesgo familiar para LES es fuerte y se evidencia por el valor de $\lambda s = 20$, el cual es bastante alto, si se considera 1.0 el valor en donde hay ausencia de agregación familiar para una enfermedad determinada (2).

Se han identificado genes candidatos en ratones cuyos loci son sinténicos con loci humanos. Tal es el caso del Sle1, ubicado en el cromosoma 1, mediador de la pérdida de tolerancia a antígenos nucleares y, por tanto, implicado en el desarrollo de autoinmunidad. Este locus es sinténico con el 1q23-42 humano (3).

Múltiples estudios de ligamiento en familias con LES, pertenecientes a diferentes grupos étnicos, han proporcionado información sobre loci de susceptibilidad (Tabla 2), en los cuales se ubican genes que posiblemente se relacionan con diferentes vías fisiopatológicas de la enfermedad (3-5). Sin embargo, sólo un número pequeño de estudios de ligamiento ha podido demostrar ligamiento confirmado, definido éste, como ligamiento altamente significativo y confirmado en una muestra independiente, tal como se resume en la Tabla 3 (2).

Tabla 2. Regiones con ligamiento para LES.

Región	Marcador	Población	LOD score (λ)
1p36	D1S468 D1S468 D1S243	Mexicana-americana Americana Americana	1.58 1.06 3.06
1p35	D1S234	Americana	1.00
1p13	D1S252	Americana	1.53
1p21	D1S1631	Americana	2.17
1q23	FcGRIIA	Afro-americana	3.37
1q31	D1S3462	Todas	3.97
1q42	D1S3462	Afro-americana	3.50
2q37	D2S125	Norte de Europa	3.59
3q26	D3S1763	Afro-americana	P=0.001
4p13 4p16	D4S1627	Irlanda	3.20
5p15	D5S1492	Suiza	1.52
11q23	D11S1998	Suiza	1.15
19q13	D19S246 D19S246	Irlanda Europea-americana	2.06 2.05

Tabla 3. Regiones cromosómicas con ligamiento confirmado para LES (2).

Cromosoma	Locus
1	1q23 1q25-31 1q41-42
2	2q35-37
4	4p16-16.2
6	6p11-21
12	12q24
16	16q12

Alteración de la inmunoregulación, autoreactividad y tolerancia.

CTLA4

En los trastornos de la inmunorregulación se encuentra el Antígeno 4 linfocítico anti-citotóxico (CTLA4), glicoproteína (CD152) expresada en los Linfocitos T activados la cual es un importante regulador negativo de la activación de las células T, por medio del efecto inhibidor de la transcripción de la IL-2 y de la progresión del ciclo celular (6,7).

El gen del CTLA-4, ubicado en el cromosoma 2q33, ha sido ampliamente estudiado (Capítulo 10). Se han reportado diversas variantes genéticas, entre ellas un microsatélite (AT)/(n) ubicado en 3'-UTR y diferentes polimorfismos de nucleótido simple (SNP): +49A>G (exón 1), -318C>T, -1661A>G, -1722T>C, ubicados en la región promotora (8,9). Algunas de estas variantes son funcionales y llevan a una disminución de la expresión del CTLA4 a nivel de la membrana del linfocito T, o influyen sobre la estabilidad del mRNA, cambios que se asocian a un aumento de la respuesta proliferativa del linfocito T (6,8,9).

De estos polimorfismos, sólo han mostrado diferencia significativa y susceptibilidad en LES el haplotipo +49A, (AT)(>19), CT60G en población española (9) y el alelo –1722C en población estadounidense, española y china (10-12).

Reacción inflamatoria: citoquinas y sus receptores

IL-1

La IL-1(α y β) tienen actividad pro-inflamatoria, regulada en parte por el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) (13,14). Los genes para la IL-1 están ubicados en 2q13. Se han descrito diferentes variantes genéticas que afectan la producción de IL-1, disminuyendo su actividad transcripcional y por ende los niveles plasmáticos de la misma, entre ellos SNPs +4845G/T y +3953C/T ubicados en el exon 5, repeticiones en tandem o minisatélites (VNTR) localizados en el intrón 2 y SNPs -889C/T, –511C/T ubicados en la región promotora del gen (13-16).

Se ha reportado asociación significativa entre la variante –889C/C de la IL-1α y LES, como factor de riesgo para población caucásica y negra. Igualmente, el alelo -511T de la IL-1b ha mostrado diferencia significativa en población negra (13). Sin embargo, diferentes estudios realizados en países como China, Australia, Japón y Taiwán no han reproducido estos hallazgos (13,15-17). En población del Noroeste de Colombia (Antioquia) se observó un papel protector del alelo IL-1β +3953T, al igual que el haplotipo –511C,+3953T, planteándose que esta protección se basa en el efecto inhibitorio del alelo +3953T en la secreción de IL-1β en condiciones inflamatorias (18).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

El TNF (α y β) y su receptor TNFR2 (CD120b) se han implicado en la patogénesis del LES, por participar en la regulación de procesos como la inflamación y la apoptosis. En el LES, la producción del TNFα está alterada y se relaciona con la actividad de la enfermedad (19).

La variante -308G/A del gen del TNF-α (6p21.31), ha sido una de las más estudiadas. Aunque algunos estudios sugirieron que el alelo A se asociaba con niveles plasmáticos de la interleuquina, estudios recientes no han confirmado el papel funcional de este SNP (20). La mayoría de los estudios han indicado una asociación del alelo mutado -308 A con LES (21). Un polimorfismo menos estudiado, es el +252 del TNFβ que ha mostrado asociación con LES en población china, coreana e inglesa (22, 23).

El gen del receptor 2 del TNF-α (TNFR2) ha sido también estudiado en LES, pues es a través de éste que el TNF desempeña su actividad biológica como citoquina pro-inflamatoria. El alelo -587G de la variante genética 196R/M del TNFR2 ha sido asociado con la enfermedad en población japonesa (20,24).

IL-10

Es una citoquina producida principalmente por monocitos y linfocitos reguladores, con efectos pleiotrópicos en la regulación de la inmunidad celular. Disminuye la expresión de citoquinas Th1 al tiempo que aumenta la sobrevida, proliferación y diferenciación de los linfocitos B.

En EAI como el LES los niveles de IL-10 están elevados y asociados con hiperactividad de células B y con hipergamaglobulinemia (25). Por lo tanto, polimorfismos funcionales de la IL-10 y de su receptor (IL-10R) se han estudiado en esta entidad. Diversas variantes genéticas (SNP) de la región promotora (-1082G/A, -819C/T y –592C/A) se han asociado con la presencia de autoanticuerpos anti-Ro y con el desarrollo de nefritis. Igualmente, microsatélites (repetición CA: IL10.R y IL10.G) ubicados en esta misma región se han visto implicados en la regulación de la transcripción de la IL-10 y por ende asociados con la enfermedad (25-27). Las variantes G241A y G520A del IL-10R no se asociaron con LES en población japonesa (28,29).

IL-4

En LES predominan las citoquinas con patrón Th2. Existen niveles altos de IL-4, citoquina que induce activación y diferenciación de células B, característica de estos pacientes. La transcripción del gen de IL-4 está positivamente regulada por el polimorfismo -590C/T, ubicado en la región promotora del gen. El alelo -590T lleva a un incremento de la actividad protéica y se asocia positivamente con la enfermedad (30). De igual forma, estudios del polimorfismo de gen del receptor de la IL-4 (IL-4R) han señalado un incremento significativo del alelo Ile50 (codón 50) y del Arg55 (codón 551) (31).

IL-6

La función biológica de esta citoquina radica en la maduración de los linfocitos B, por esto diferentes estudios experimentales y clínicos han indicado que la IL-6 participa en el desarrollo de esta entidad. En pacientes con LES, los niveles de IL-6 se asocian con la actividad de la misma, principalmente en aquellos que presentan serositis, nefritis y compromiso del sistema nervioso central (32).

La regulación de la producción de la IL-6 está mediada genéticamente, al igual que con otras citoquinas. El polimorfismo funcional de la IL-6 -174G/C, se ha estudiado en LES, evidenciándose que el alelo -174G, se asocia con niveles plasmáticos elevados, anticuerpos anti-histona y presencia de lesiones discoides en la piel, pero no contribuye a la susceptibilidad de la enfermedad (32). De igual forma, un minisatélite-AT (alelo < o = 792pb) ubicado en la región 3´ del gen se ha encontrado fuertemente asociado al LES. Al parecer su efecto funcional está relacionado con la estabilidad del RNAm y por ende con los niveles de la citoquina (33).

Interferón-gamma (IFN-γ)

Es una citoquina producida por los linfocitos Th1, estimula la activación de macrófagos y la diferenciación de dichos linfocitos. No obstante, a pesar que el LES es una enfermedad en donde predominan citoquinas Th2, los niveles de IFN-γ se encuentran aumentados (19) y se correlacionan con la severidad de la enfermedad, incluyendo la nefritis (34).

La frecuencia del alelo 114 de un microsatélite del intrón-1 se ha asociado significativamente con el patrón histopatológico de glomerulonefritis membranosa (34). Igualmente, dos SNPs en el receptor 1 (Val14Met) y 2 del IFN (Gln64Arg), se asocian con la enfermedad, el haplotipo de riesgo propuesto para LES es Met14/Val14 y Gln64/ Gln64 (35).

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un fenómeno biológico fundamental que desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, y está sujeto a un control complejo que involucra múltiples genes reguladores específicos.

Gen PDCD1 (Muerte celular programada 1)

Es un miembro de la familia de los receptores CD28, con función moduladora sobre la actividad de los linfocitos. EL PDCD1 es un dominio intracelular inmunomodulador expresado en linfocitos T y B, se une a dos ligandos específicos que se encuentran en múltiples tejidos (PD-L1 y PD-L2) atenuando la respuesta celular. Esta función es crítica para la prevención de autoinmunidad y es necesario como regulador negativo de la reactividad inmunitaria de los linfocitos. Además de su actividad como molécula de plausibilidad biológica en LES, el gen del PDCD1 se encuentra localizado en el 1q23, loci que ha mostrado ligamiento positivo con LES en diferentes poblaciones estudiadas (36).

Existen diferentes SNPs de este gen con grados variables de asociación con el LES. El polimorfismo 7146G>A ubicado en el intrón 4, se ha visto segregado en familias con LES y su alelo A se asocia con la aparición esporádica de la entidad en población europea, americana y mexicana. La implicación funcional de este SNP podría deberse a la interferencia sobre un factor transcripcional (RUNX1), que modificaría la expresión de la molécula (37,38).

Fas/APO-1 (CD95) y su ligando (FasL)

La Apo-1/Fas (CD95) es una proteína transmembrana, expresada en la superficie de las células. La expresión aberrante del producto de su gen se ha encontrado en muchos desórdenes inmunitarios (39). Se han estudiado diferentes polimorfismos de la región promotora que afectan la expresión de la proteína. El polimorfismo -670A>G (alelo A) está asociado con LES en población japonesa, a diferencia del SNP -1377G>A que no mostró incremento significativo en la entidad. Además, el alelo -670A se relaciona con anticuerpos anti-RNP en estos pacientes (39,40). El genotipo silente 297C/417G se ha visto igualmente asociado a la enfermedad, y probablemente está en desequilibrio de ligamiento con otra variante genética que influye sobre la tasa de transcripción del CD95 (41).

El FasL es un miembro de la superfamilia del TNF que se expresa en células del sistema inmune y se une al CD95 promoviendo la tolerancia inmune a través de la inducción de apoptosis de linfocitos y macrófagos activados. Fas L puede dar señales coestimuladoras, de ahí la importancia del equilibrio entre estas dos clases de señales, coestimuladoras e inhibitorias, para prevenir el desarrollo de autoinmunidad; por tanto, el gen del FasL (1q23) se considera buen candidato a estudio en esta entidad. El polimorfismo -844C>T se ha asociado con autoinmunidad, y su alelo -844C se asocia con un incremento en la expresión del FasL, así como con LES (42).

ADP- ribosiltransferasa (PARP)

El gen de la PARP codifica para una enzima nuclear que media la ribosilación de las proteínas y es de suma importancia en la reparación del DNA, proliferación, respuesta al estrés, apoptosis, estabilidad genómica y malignidad (43).

Alteraciones en la transcripción del gen PARP, por polimorfismos funcionales ubicados en la región promotora, se han visto implicados en EAI como el LES. Los polimorfismos de dinucleótido de repetición CA, ubicado en el primer exón, han mostrado asociación y ligamiento con LES en poblaciones étnicamente diferentes (europea y americana) (43-45).

BCL-2

Este gen codifica para una proteína ubicada en la membrana intracelular que actúa sinérgicamente con otras proteínas para prevenir la apoptosis en respuesta a diversas señales; sin embargo, su mecanismo de acción no es aún muy claro.

La sobreexpresión del bcl-2 en los linfocitos B de pacientes con LES ha sido señalada (46). Diferentes variantes genéticas del bcl-2 se han estudiado en LES, tales como SNP 95A>G y 1955A>G, o microsatélites (alelo 193 y 195) sin hallar asociación en poblaciones mexicana y sueca (47).

Procesamiento antigénico y depuración de complejos inmunes

El procesamiento defectuoso de los detritos celulares contribuye al desarrollo de LES. Existe evidencia de que el sistema inmune innato a través de la proteína C-reactiva (CRP), el complemento y receptores para la fracción constante de inmunoglobulinas, pueden actuar como protectores de autoinmunidad (Capítulos 2 y 22).

Lectina Ligadora de Manosa (MBL)

Es una proteína que se caracteriza por poseer un dominio de lectina con capacidad de reconocer carbohidratos, principalmente manosa y el oligosacárido N-acetilglucosamina, presentes en la superficie celular de levaduras, bacterias y virus, y una vez se ha unido a estas moléculas actúa como un iniciador de la tercera vía de activación del complemento. (48). Se han estudiado diferentes variables genéticas funcionales de la MBL, como mutaciones en los codones 52, 54 y 57, las cuales se han asociado con LES como factores de riesgo no convencionales. Estas variantes se relacionan con niveles alterados de la proteína en suero y explicarían, en parte, la reducción de la depuración de complejos inmunes y anomalías en la activación del complemento (49). Sin embargo, estas mutaciones no se han asociado al LES en todas las poblaciones (50). Dos polimorfismos en la región promotora (-550G>C y –221G>C) se han estudiado en LES. Los resultados han sido contradictorios, pues se observó asociación en asiáticos pero no en españoles (48,51).

Receptores para el Factor Constante de la Inmunoglobulina G (FcγR)

Los receptores para el dominio del factor constante (Fc) de la IgG se encuentran en la superficie de células hematopoyéticas y constituyen un puente de unión entre la inmunidad humoral y celular. Existen tres clases de receptores, FCγRI, FCγRII y FCγRIII, importantes para el anclaje de complejos inmunes y en la depuración de células apoptóticas (ver Capítulo 5), procesos que se han visto alterados en pacientes con LES (52,53).

Los polimorfismos funcionales de los FCγR afectan la habilidad receptora y por tanto no existe una depuración efectiva de complejos inmunes, lo que puede desencadenar respuestas autoinmunitarias, como las que se presentan en el LES. Tal es el caso de los alelos R131 del FCγRIIa (131R>H), F176 (176V>F) del FCγRIIIa, el alelo 232T (I232I>T) del FCγRIIb y el alelo NA2 del FCγRIIIb, los cuales se han asociado con la enfermedad en diferentes poblaciones (52-55).

Complemento

El sistema del complemento está implicado en la respuesta inmune primaria y en la inflamación (ver Capítulo 4). Participa en los procesos de opsonización y fagocitosis (C1q, C3b y C4b), activación de linfocitos B (C3d), aumento de la respuesta inmune humoral (C3d), depuración de complejos inmunes y de células apoptóticas (C1 y C4), quimiotaxis y activación de leucocitos (C5a, C3a y C4a) y formación del complejo de ataque a la membrana (C5b a C9). En LES puede observarse deficiencia en algunos componentes del complemento, como el C1q, C3 y C4, lo que se asocia a un depuramiento defectuoso de complejos inmunes y alteraciones en la fagocitosis de células apoptóticas (56).

Una variante genética del C1q (Gly70GGA) se ha asociado con niveles séricos bajos de la proteína en pacientes con LES cutáneo (57). Igualmente el alelo nulo del C4A (C4A*Q0: deleción) se ha asociado fuertemente con el desarrollo de LES (58).

El polimorfismo 981Q>H (alelo 981H) del E-CR1 (receptor eritrocitario del complemento 1) se ha asociado con bajos niveles de la proteína, pero con un aumento de la afinidad de éste al C4b, fenómeno que compensa las alteraciones de la opsonización de complejos inmunes. Este polimorfismo confiere un efecto protector para LES (59).

Proteína C-Reactiva (CRP)

La CRP, un reactante de la fase aguda, tiene la capacidad de reconocer restos celulares apoptóticos, constituyentes específicos de la membrana celular y material nuclear, que se comportan como autoantígenos en el LES. En el proceso de depuración de ligandos autólogos, la CRP se une a componentes del complemento, como el C1q, y permite el depósito del C3b, para actuar como opsonina facilitando la fagocitosis. A través de este proceso, la CRP promueve el desecho efectivo de detritus celulares, evitando que se monte una respuesta inmune específica y reduce, por tanto, la inmunogenicidad de éstos (60).

Estudios familiares y entre gemelos han mostrado que las concentraciones de CRP son un rasgo con un alto componente hereditario, por lo tanto variantes del gen podrían determinar los valores basales de esta proteína. En el LES se da una falla relativa en la respuesta de la CRP

durante fases activas de la enfermedad, a pesar de existir un estímulo inflamatorio tisular evidente. Se encuentran niveles bajos de la proteína con incrementos en IL-6, principal regulador de la síntesis de la CRP (61). Hasta el momento, dos polimorfismos 641G>C y 1846G>A, se han relacionado con niveles bajos de CRP y éste último ubicado en la región 3´ no transcrita del gen se encontró asociado con el desarrollo de la enfermedad y con niveles elevados de anticuerpos antinucleares (62).

Otros genes: reactividad endotelial

Óxido Nítrico Sintasa (NOS)

En LES existe disfunción endotelial producida por el depósito de complejos inmunes y anticuerpos contra la célula endotelial. El óxido nítrico (NO), es producido en el endotelio vascular a partir de un aminoácido simple, la L-arginina, y por la acción enzimática de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) (63).

La activación de células endoteliales, como parte de la disfunción endotelial, produce grandes cantidades de NO, que participa en la citotoxicidad y en el daño tisular. La frecuencia de los polimorfismos del gen de la NOSe son variables de una población a otra (63). Variantes genéticas de la NOSe como el VNTR ubicado en el intrón 4, y los polimorfismos -786T>C (promotor) y 894G>T (exón 7) han sido estudiados en diversas poblaciones incluyendo la colombiana, donde se observó que sólo el alelo b del intrón 4 predispone a LES, posiblemente por estar asociado con niveles elevados de la enzima (63).

Variaciones en la óxido nítrico sintasa inducible (NO Si) se han visto implicados en la patogénesis de la nefritis, disfunción endotelial y lesiones cutáneas en LES. Su polimorfismo -954G>C ha sido identificado como un factor de riesgo significativo en población americana negra; sin embargo estos hallazgos no han sido reproducidos en población española (64,65).

Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La angiotensina II (ATII) es el principal efector del sistema renina-angiotensina, una molécula pleiotrópica con funciones vasoactivas, implicada en el remodelamiento tisular y en la fibrosis. Además, es un potente modulador pro-inflamatorio con habilidad para perpetuar y aumentar la respuesta inmune en diversos tejidos (66).

La ATII es un buen candidato involucrado en los procesos de autoinmunidad, nefritis y daño visceral en LES. Polimorfismos implicados en la expresión genética de la ECA, enzima que media su producción, se han planteado como determinantes para el desarrollo de esta entidad o su severidad; sin embargo, el polimorfismo I/D, candidato de susceptibilidad, no ha sido confirmado (66-69).

Artritis Reumatoide

La AR es una enfermedad crónica inflamatoria poliarticular de etiología desconocida, caracterizada por una marcada hiperplasia sinovial, neovascularización e infiltrado de predominio mononuclear, que se asocia con destrucción progresiva de las articulaciones. Se ha descrito un alto nivel de concordancia entre gemelos monocigotos 15.45% versus gemelos dicigotos 3.6% (70). Existe una alta agregación familiar, representada por un aumento del 5 al 8 % en el riesgo de presentar AR si se tiene el antecedente de un hermano con la enfermedad (71,72). Estos aspectos proporcionan una fuerte evidencia del papel de los factores genéticos en la patogénesis de este desorden.

La asociación entre el riesgo de enfermedad y diferentes alelos del HLA ha sido bien establecida, en particular con alelos del HLA-DRB1 (*0101, *0401, *0404 y *0405) (73). Sin embargo, la AR es también una entidad poligénica, en la cual se ha encontrado ligamiento positivo con otras regiones cromosómica no HLA, tales como, 1p13, 6p21, 16p13-q12.2, 18q21, y particularmente en la regiones 16cen, 6q y 12p existe evidencia significativa de ligamiento, haciendo a estas regiones candidatas para ser estudiadas con marcadores adicionales (74).

Reacción inflamatoria: citoquinas y sus receptores

TNFα

En la región 6p21 se encuentra localizado el gen que codifica para el TNFα, molécula cuyos niveles séricos y sinoviales se encuentran elevados en pacientes con AR. El TNFa se considera un factor que contribuye de manera significativa al daño tisular y destrucción articular en estos pacientes. Diferentes polimorfismos en la región promotora de este gen se han descrito y estudiado en AR. Estudios de asociación genética entre los polimorfismos -308G>A, -238G>A y -850C>T, y AR no han mostrado asociación positiva (75). Estudios posteriores replicados en población española, no mostraron asociación entre los polimorfismos ubicados en la región promotora del gen (-308 y -238) con susceptibilidad a desarrollar AR, sin embargo este estudio encontró una diferencia significativa entre la variante -238 y el inicio de la enfermedad (76). Resultados que fueron replicados en otro estudio español (77), en el cual se encontró que el microsatélite TNFa/b está asociado con AR y que esta asociación es independiente de una asociación adicional a alelos HLA-DR. Dos estudios realizados en población japonesa no encuentran asociación positiva con estos polimorfismos, aunque si una fuerte asociación con HLA-DRB1 (78,79), y aunque se logró evidenciar una frecuencia mayor de la variante -857T entre los pacientes con AR comparado con los controles, el análisis de HLA-DRB1 en los mismos sujetos mostró que el alelo DRB1*0405 estaba en desequilibrio de ligamiento con -857T, y se asoció de manera más fuerte que el alelo -857T.

Varios estudios han analizado la asociación entre polimorfismos del TNFα, susceptibilidad a la enfermedad y progresión de ésta. Un estudio, el cual analizó los polimorfismos ubicados en las posiciones -308, -238, -376, -163 y +70, con el riesgo de enfermedad y con la progre-

sión, encontró que ninguno de estos polimorfismos se asocia de manera positiva con susceptibilidad o severidad de la AR, sin embargo el polimorfismo -238GA se asoció con una progresión lenta de la enfermedad evaluada por hallazgos radiológicos (80). Un estudio posterior analizó el polimorfismo ubicado en la posición +489 asociado con la severidad de la enfermedad, encontrando que los individuos portadores de la variante +489GA tenían 3.9 veces menos probabilidad de padecer enfermedad erosiva comparado con los pacientes portadores del alelo +489 GG, hallazgo que fue confirmado en un estudio prospectivo usando una cohorte de 112 pacientes seguidos por 12 años (81). Un estudio similar realizado en población italiana encontró que el genotipo -238AG estaba ausente en pacientes con AR severa, mientras que pacientes con AR moderada tenía la misma frecuencia de este alelo con respecto a los controles, sugiriendo que la homocigocidad para el alelo 238GG se asocia positivamente con AR severa. Con respecto a polimorfismo ubicado en la posición +489 del gen, el mismo estudio propone que la homocigocidad para el alelo +489AA actuaría como factor de protección para una progresión rápida y severa de la enfermedad (82).

En población americana, Mu H. et al (83), analizado la asociación entre polimorfismo TNFα y la severidad de la enfermedad, encuentra que este polimorfismo se asocia de manera positiva con AR severa por medio de la interacción con el HLA-DRB1. En población colombiana se observó una asociación del haplotipo TNF -308A-238G con la enfermedad (21).

IL-10

Esta citoquina es autorreguladora de la respuesta inmune, tanto humoral como celular; sin embargo, también es claro su papel en la estimulación de las células B, en las cuales aumenta su proliferación y diferenciación (84).

En pacientes con AR se han identificado niveles séricos y sinoviales aumentados de esta citoquina, por esto su gen es candidato para el estudio de la inmunogenética de esta entidad. Independientemente de la importancia aparente de esta molécula en la génesis de la AR, varios estudios tratando de encontrar asociación entre fenotipo (niveles séricos de IL-10) y genotipo (polimorfismos del gen de la IL-10), no han logrado mostrar asociaciones fuertes. Un estudio realizado en población caucásica inglesa analizando dos polimorfismos ubicados en la región promotora del gen (-533 y -1120), no lograron encontrar asociación positiva con AR (85). En población sueca se analizó el polimorfismo ubicado en la posición -1087 del gen de la IL-10, no encontrándose asociación con AR. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la distribución de frecuencias de los genotipos GG, GA, y AA -1087 entre el grupo de mujeres con AR y el grupo de mujeres control, diferencias que no fueron encontrados en el grupo de hombres (86).

Un estudio conducido en población caucásica inglesa y negra surafricana de origen Zulú y Sotho, analizó la asociación entre dos microsatélites, el IL10.R2, asociado previamente con niveles séricos elevados de IL-10 y el IL10.R3, asociado con niveles bajos de la citoquina. Ninguno de los dos polimorfismos se asoció con la enfermedad; sin embargo, la variante IL10.R2 fue significativamente más frecuente en población de origen surafricano que en la población caucásica (87,88). Estos estudios parecen indicar que los niveles séricos de esta citoquina quizás no corresponden a una variante genética, al menos de las estudiadas, sino a un evento consecuente de las alteraciones primarias identificadas en la inmunoregulación.

IL-1, IL-2, IL-4 e IL-6

La IL-1 se considera como el principal mediador de destrucción articular. El balance entre la IL-1 y su antagonista competitivo, el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra), pueden contribuir en la patogénesis de la AR, lo que hace que estos genes sean candidatos para estudios de asociación genética (89). En franceses, el alelo raro +3954T se encontró con mayor frecuencia en pacientes con AR destructiva comparado con aquellos con artritis reumatoide no destructiva. Esta asociación fue independiente de HLA DR4/DR1, por lo tanto se considera que este polimorfismo podría ser un marcador de severidad especialmente de destrucción articular en AR (90). En españoles, el estudio de los SNP en las posiciones -384 y 114 del gen que codifica para la IL-2 no mostró asociación con la enfermedad (91).

También se han estudiado polimorfismos en el gen que codifica para la IL-4. Un estudio realizado en población caucásica inglesa, analizó un VNTR ubicado en el intrón 4 del gen que codifica para la IL-4, y encontró que el alelo raro IL-4(2) estaba con mayor frecuencia en aquellos pacientes con AR no destructiva, por lo tanto se plantea que este polimorfismo pudiese ser un factor protector para la destrucción articular en AR y que podría ser usado como un marcador pronóstico (92). En franceses, se observó asociación significativa entre AR y el alelo RP1 de la IL-4 (93).

Con respecto al gen de la IL-6, un estudio realizado en población española no observó asociación con polimorfismos ubicados en las posiciones +622 y -174 (94). Crilly et al, estudiando una zona altamente polimórfica rica en repeticiones AT en la región 3´ del gen de la IL-6, identificó nueve alelos de los cuales los alelos G8, G7 y G4 se encontraron con mayor frecuencia en pacientes con AR que requirieron cirugía (95).

Alteración de la inmunoregulación, autoreactividad y tolerancia

CTLA-4

El gen del CTLA4 ha mostrado ligamiento y asociación significativa con diferentes EAI, como la DMT1 y EAIT (96). Para este gen se han descrito tres variantes y de ellas, la ubicada en el exón 1 (+49G/A) ha sido la más estudiada en AR; sin embargo, los estudios realizados en

TABLA 4. Estudios de asociación entre el polimorfismo +49G/A del gen CTLA4 y AR.

		Muestra		
Referencia	Población	Casos	Controles	Asociación
Barton A, 2004 (96)	Caucásica	759	755	No
Lee CS, 2003 (97)	Asiática	186	203	Si
Lee YH, 2002 (98)	Asiática	86	86	No
Milicic A, 2001 (99)	Caucásica	421	452	No
Barton A, 2000 (100)	Caucásica	192	96	No
Matsushita M, 1999 (101)	Asiática	56	100	No
González MF, 1999 (102)	Caucásica	138	305	Si

diferentes poblaciones muestran resultados contradictorios (Tabla 4).

Procesamiento antigénico y depuración de complejos inmunes

Receptor Fcγ IIIA

El factor reumatoideo (FR) es una característica de la AR. El FR es un auto-anticuerpo que reconoce la región constante de la IgG, y la presencia de complejos IgG-FR se ha visto correlacionada con la presencia de manifestaciones extraarticualres y la severidad de la enfermedad (103).

La IgG conformando complejos inmunes se une a receptores especializados que se encuentran en células inmunes efectoras, de los cuales se han descritos tres clases, entre ellos el receptor para el Fcγ tipo IIIA parece que juega un papel relevante en la depuración de estos complejos. La presencia de la sustitución de una T por una G en la posición 559 del gen, determina cambios de una fenilalanina por una valina en la posición 158 de la proteína madura, lo cual está directamente relacionado con la afinidad del receptor por los complejos descritos anteriormente (104).

El receptor Fcγ IIIA que posee valina, es de alta afinidad por los complejos inmunes, lo que puede potencialmente contribuir a desarrollar la AR por el incremento de la activación del macrófago en respuesta al complejo IgG-FR, contribuyendo a la persistencia de la respuesta inflamatoria y por ende al daño tisular y a la severidad de la entidad, teoría que está apoyada por diferentes estudios realizados en población caucásica, donde la variante 158 VV del Fcγ IIIA se asoció con la presencia de enfermedad y la severidad de la misma. Este hallazgo fue replicado en población hindú (103-105), pero no en otras (106,107).

TAP

Los genes (TAP1 - TAP2) de las moléculas transportadoras asociadas al procesamiento antigénico (TAP), están localizados dentro del CMH Clase II, entre los loci de HLA-DQ y HLA-DP. Estos genes codifican para un heterodímero complejo que es responsable del transporte citoplasmático de fragmentos peptídicos, proceso importante en la selección de los epítopes que serán presentados al sistema inmune, por lo que juegan un papel relevante en el proceso de selección y maduración del linfocito T, y por ende en la iniciación y regulación de la respuesta inmune. Se han descrito cuatro variantes en el TAP1 y ocho en la TAP2, pero solo la variante ubicada en el exón 9 de este gen (TAP2 565), ha mostrado asociación con AR en población caucásica y asiática (108,109).

Peptidilarginina deaminasa 4 (PADI4)

Esta molécula es un miembro de la familia de proteínas codificadas por genes PADI, los cuales codifican para enzimas que están relacionadas con la conversión postraduccional de los residuos de arginina a citrulina. Anticuerpos antipéptidos citrulinados cíclicos (CCP) son altamente específicos de la enfermedad (110).

A pesar de que estudios realizados en población caucásica y japonesa mostraron ligamiento significativo con la región 1p36, en la cual se ubica este gen (72), los polimorfismos asociados con PADI4 en población japonesa (111) no fueron confirmados en población caucásica (112).

MBL

Algunos estudios han planteado que la presencia de variantes genéticas que producen no sólo una reducción cuantitativa sino también funcional de esta proteína, se asocian a una mayor presencia de infecciones y de entidades autoinmunes, como LES y AR (113). La sustitución de una glicina por un ácido aspártico en el codón 54 ha sido evaluada en pacientes con AR, pero los hallazgos son contradictorios. Tres estudios (49,113-114) han mostrado correlación entre el ser portador de la variante, con menores niveles séricos de la proteína y presencia de enfermedad; mientras que otros tres trabajos realizados en población asiática y caucásica no mostraron diferencias significativas (50, 115-116).

Esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad autoinmune desmielinizante con inflamación del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por la presencia de linfocitos T autorreactivos y anticuerpos contra la mielina. Se han planteado dos fases de la enfermedad: inflamación y degeneración (117, 118). Al igual que otras EAI se ha visto agregación familiar, con un λs entre 20 y 40 (117-120). Estudios realizados en gemelos reportan una concordancia del 25% en

monocigotos y de sólo un 5% en dicigotos. Estos hallazgos sustentan que múltiples marcadores están involucrados en determinar la susceptibilidad genética a la enfermedad (118).

Los estudios realizados en familias con EM han mostrado ligamiento significativo con la región 6p (118,119, 121), 5p y 17q22 (ver Capítulo 28).

Alteración de la inmunorregulación, autorreactividad y tolerancia.

CTLA4

El CTLA4, ya señalado como un importante regulador negativo de la activación de las células T, inhibe la transcripción de la IL-2 y la progresión del ciclo celular (ver Capítulo 10) (7,122). En población noruega, el genotipo 49A/G fue asociado con la enfermedad (123), pero no en polacos (124); no obstante, en estos últimos los portadores del genotipo AA y AG presentaron un riesgo 4.4 veces más alto de recaídas recurrentes y progresión rápida de la enfermedad que aquellos que fueron portadores del genotipo GG, sugiriendo que el polimorfismo A49G del gen CTLA-4 se asocia con la progresión de la enfermedad (124). En norteamericanos el haplotipo 5´(318)*C/E1(49)*A/3´(514*AT(8) se asoció con la EM (125).

Reacción Inflamatoria: citoquinas y sus receptores

IL-1

En pacientes con EM es evidente la elevación de IL-1β en lesiones del SNC y disminución en la producción del IL-1RA. En población caucásica proveniente del norte de Europa se encontró asociación con el alelo 2 del polimorfismo VNTR del IL-1RN, pero no con la severidad de la enfermedad (126). En finlandeses y japoneses no se observó asociación con el cluster de IL-1 (127-129).

TNF

El TNFα ha sido implicado en la patogénesis de la EM, por participar en procesos de inflamación y autoinmunidad (121). A pesar de ser considerada en diferentes estudios como citopatogénica, esta citoquina tiene efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores en enfermedades desmielinizantes. El alelo TNF2 (A) ha sido señalado ser protector para la EM (130,131). En españoles el alelo -376A TNF fue asociado con la enfermedad (132,133).

IL-10

Esta citoquina inmunorreguladora con un papel importante en la reacción inflamatoria e inmune, ha sido estudiada ampliamente en EM, encontrando que niveles elevados de IL-10 se correlacionan con la remisión de la enfermedad, lo cual sugiere que la producción endógena podría estar regulando el ciclo de la misma, e insinúan su posible uso terapéutico (134-136). Las variantes genéticas de la región promotora de la IL-10 -1082G/A, -819C/T y –592C/A no han mostrado asociación significativa con la enfermedad (135,136). Sin embargo, el alelo -2849A se ha asociado con mayor recaídas que los portadores del alelo -2849G. Al correlacionar estos hallazgos con los niveles séricos de IL-10, se encontró que los portadores homocigotos para el alelo A, -2849AA tenían una producción un 15% menor del IL-10 comparados por los individuos con genotipo -2849AG/GG (137).

IL-6

La IL-6 desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en EM; ha sido implicada en la etiología de encefalitis autoinmune experimental en animales transgénicos y existe evidencia que contribuye en procesos neuropatológicos en humanos. Se acepta que la regulación de la producción de IL-6 está en parte mediada genéticamente, demanera similar a lo que ocurre con otras citoquinas (138), por lo tanto, el estudio de polimorfismos funcionales podría asociarse con la enfermedad. Sin embargo, estudios de polimorfismos ubicados en la región promotora del gen, -174G/C y –597G/A, no han mostrado asociación con la enfermedad ni con el curso de la misma (139).

Un estudio realizado en 192 familias cerdeñas analizó minisatélites localizados en la región 3´ del gen y halló 9 alelos con longitud en pares de bases diferente (A1 608pb, A2 615pb, A3 618pb, A4 640pb, A5 650pb, A6 658pb, A7 670 pb, A8 686 pb, A9 765 pb). El alelo A5 se asoció con el curso de la enfermedad, en especial el genotipo A5/A5 fue significativamente más frecuente en pacientes con inicio temprano de la enfermedad. Pacientes portadores de los alelos A8 y A9, se asociaron con alteraciones en el curso e inicio de la enfermedad (140).

Alteraciones en las proteínas de la mielina

Glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG)

Es una proteína integral de membrana específica del sistema nervioso central, expresada principalmente en el exterior de la mielina laminar y en la superficie de los oligodendrocitos. Es un componente menor de la mielina, que constituye el 0.01 -0,05% del total de proteína de mielina. Su función biológica se ha asociado con el proceso terminal de mielinización y podría estar haciendo parte de la cadena para mantener la compactación de la mielina, estabilizando los microtúbulos en los oligodendrocitos (141,142). En modelos animales, la MOG exhibe características altamente inmunogénicas en lesiones inflamatorias desmielinizantes, y la implican como un autoantígeno en EM, ya que existe una respuesta predominante del linfocito T y la presencia de autoanticuerpos contra ella en pacientes con EM (141,142).

Se han descrito varios polimorfismos en el gen que codifica para la MOG, ubicados en diferentes regiones del gen, exón 2: 215C/ A, 284G/C, exón 4: 511 G/C, y en la región promotora -1077T/C, -918G/A, -875A/C. Sin em-

bargo, éstos no parecieran conferir susceptibilidad para desarrollar la enfermedad (141-144).

Glicoproteína Asociada a la Mielina (MAG)

Es una glicoproteína mayor de la mielina no compactada, pertenece al subgrupo de la familia de inmunoglobulinas denominadas sialoadesinas, se ha propuesto que es la responsable de mantener el contacto entre las células formadoras se mielina y el axón (145,146). Varios reportes indican que la MAG desempeña un papel importante como autoantígeno en enfermedades desmielinizantes autoinmunes, como la EM.

Estudios de inmunohistoquímica revelan que la MAG está ausente en las regiones más externas de las placas activas y que esta pérdida es proporcionalmente mayor que para otras proteínas de la mielina. Además, se reconoce que la degradación del MAG es un hallazgo temprano en la inmunopatogénesis de la desmielinización en EM (145,146).

Diferentes estudios de asociación y ligamiento han reportado efecto significativo del locus 19q13 (región cromosómica donde esta ubicado el gen MAG) para susceptibilidad en EM (147). Se han reportado varios SNPs en el gen MAG, sin embargo, ninguno ha mostrado asociación importante con la enfermedad. Algunos de estos son: -114C/T, +10C/T, +185C/T, +616T/C, +133C/T y +403C/T (145,147).

Proteína Básica de la Mielina (MBP)

La autoinmunidad contra la proteína básica de la mielina u otros de sus componentes, se ha propuesto como mecanismo fisiopatológico que lleva a la desmielinización en pacientes con EM. Un microsatélite, compuesto por repeticiones de tetranucleótidos (TGGA)n, localizado 1 Kb corriente arriba del exón 1 del gen MBP fue asociado con EM en población canadiense, finlandesa y norteamericana (148,149), pero no en italianos (150), ingleses (151), ni en la población de la Isla Mediterránea de Cerdeña (152). Allí, además de ser posiblemente un aislado genético con baja mezcla, la incidencia de la enfermedad es de 140 casos por 100.000 habitantes, la más alta en Europa.

Mediación del proceso de apoptosis

Fas/APO-1 (CD95)

La Apo-1/Fas (CD95) es una proteína de transmembrana, implicada en apoptosis y desempeña un papel importante en la función y la regulación del sistema inmune. Su gen está localizado en la región cromosómica 10q23 la cual se ha encontrado ligada a EM (153,154).

Dos SNPs del gen CD95 han sido estudiados en pacientes con EM. En población americana los polimorfismos -670A/T y 74C/T, se asociaron con la enfermedad en mujeres. La homocigocidad para el alelo -670A o para el alelo 74C explicó el 28% del riesgo en mujeres para desarrollar EM pero no en hombres (155). En población sueca el alelo -670G fue protector para EM (156).

Disfunción endotelial

NOS

El óxido nítrico (NO) es un mediador no específico de inflamación que interviene en el efecto excitatorio del glutamato en el cerebro y es sobreexpresado por células de la glía activada en los procesos inflamatorios asociados a la EM. El exceso de NO se asocia con daño tisular y síntomas neurológicos como consecuencia de la muerte de oligodendrocitos y destrucción del axón. Se ha detectado una actividad incrementada de la NOSi en el líquido cefalorraquídeo de pacientes y concentraciones elevadas de NO que se correlacionan con la actividad de la enfermedad (157). No obstante, estudios en población australiana indicaron ausencia de asociación entre un microsatélite del gen de la NOSi y la enfermedad (158,159).

Otros genes asociados

Apolipoproteína E (ApoE)

La ApoE es una proteína asociada a la regeneración de axones y mielina después de lesiones en tejido nervioso central y periférico. Sus diferentes isoformas han mostrado tener efecto diferencial sobre el crecimiento neuronal. Dado que en pacientes con EM se ha observado una disminución en las concentraciones de ApoE en LCR, se ha propuesto que la disminución intratecal de la síntesis de ApoE se asocia con exacerbaciones de la enfermedad. De la ApoE se han descrito tres isoformas codificadas por los alelos e2, e3 y e4 (160,161).

En población caucásica inglesa el alelo e4 se asoció a la enfermedad y a su progresión (162). En población italiana no se observó asociación con los tres alelos ya mencionados; pero pacientes portadores del alelo e2 iniciaron de manera tardía la etapa de progresión hacia la fase crónica de la enfermedad (163). En población norteamericana el alelo e4 (APOE-4), confiere probabilidad mayor de ser afectado por una forma severa de la enfermedad, mientras los portadores del alelo e2 (APOE-2) tienen riesgo de presentar una forma moderada de la enfermedad (164).

Diabetes mellitus tipo 1

La DMT1A se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β en los islotes del Langerhans del páncreas (ver Capítulo 25). La respuesta celular causante del daño tisular se caracteriza por la presencia de linfocitos T-autoreactivos dirigidos contra proteínas específicas de la células, incluyendo la insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y la enzima tirosin fosfatasa (IA-2). Anticuerpos contra éstas son detectables en más del 90% de los pacientes (165). Se ha descrito que cerca del 20% de los pacientes con DMT1A presentan además anticuerpos anti-tiroideos y de estos el 50% desarrollan enfermedad autoinmune tiroidea (EAT) clínicamente manifiesta (166). La fisiopatología común y la tendencia a presentarse asociadas, sugieren que en su etiología pueden estar involucrados factores genéticos comunes.

Los determinantes genéticos de susceptibilidad para DMT1A son actualmente más comprendidos que los factores de riesgo medioambientales. Se ha descrito que la concordancia entre gemelos monocigotos es de cerca del 30 a 70%, mientras que la concordancia en gemelos dicigotos es del 11% (167). Igualmente se ha calculado que el 6% de los hermanos de personas con DMT1A también desarrollan esta entidad (λ=15), comparado con una prevalencia en la población general de 0.4% (168).

Desde mediados de la década de los 90, se han incrementado el número de estudios publicados en los cuales se hace barrido a lo largo del genoma en familias con dos o más hermanos afectados, con el objetivo de identificar loci que confieran susceptibilidad genética para esta enfermedad. Se han descrito cerca de 20 loci, denominados con la abreviación IDDM y el número en secuencia (Tabla 5) (167). Tres de estos loci han sido bien caracterizados para DMT1A. El IDDM2 codifica para la insulina, el IDDM12 codifica para la molécula CTLA-4 (169), y el IDDM1 corresponde a la región donde se encuentra los genes HLA-DR y HLA-DQ, que proporcionan entre el 40 a 60% del riesgo heredable para DMT1A (170).

Tabla 5. Principales loci con ligamiento para DMT1 en barridos amplios del genoma.

Nominación	Locus	Marcador
IDDM1	6p21	HLA-DR/DQ
IDDM2	11p	Insulina (VNTR)
IDDM3	15q	DD15S107
IDDM4	11q	D11S987
IDDM5	6q	D6S476
IDDM6	18q	D18S64
IDDM7	2q	D2S152
IDDM8	6q	D6S264
IDDM9	3q	D3S1279
IDDM10	10p/10q	D10S191
IDDM11	14q	D14S67
IDDM12	2q	D2S72
IDDM13	2q	D2S164
IDDM15	6q	D6S283
IDDM16	14q	IgH
IDDM17	10q	D10S554
IDDM18	5q	IL-12B 3'UTR
IDDMx	Xp	DxS1068

Alteración de la inmunoregulación, autoreactividad y tolerancia

IDDM2 – Insulina

La región 11p ha sido consistentemente asociada con DMT1A y se considera que contribuye aproximadamente al 10% de la susceptibilidad genética para esta entidad. La principal característica de este locus es la presencia de un VNTR localizado a 590 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de la insulina. Esta variante regula la tasa de transcripción de este gen (167).

Se han establecidos tres clases de alelos para este VNTR, basados en el número de repeticiones en secuencia de 15-20 pb, las cuales se han denominado de la siguiente manera: clase I (20-63 repeticiones), clase II (64 -139 repeticiones) y clase III (140-210 repeticiones). La clase I se asocia con susceptibilidad a DMT1A, partiendo de una alta frecuencia de presentación (75 a 85%) en comparación con la población general (50 a 60%); mientras que la clase III, que es poco frecuente, se relaciona predominantemente como factor protector para esta entidad (171).

Una hipótesis que explica la relación de este locus, fue formulada después de describir el impacto del VNTR en la tasa de transcripción del gen de la insulina y de identificar que dicha transcripción es llevada a cabo en el timo, tanto en la etapa fetal, como en la niñez y en la vida adulta (172,173). Partiendo de esto, cabe recalcar que aquellas moléculas propias que son expresadas en el timo, son determinantes en el proceso de selección negativa de los linfocitos T en maduración, y que este proceso es dosis dependiente.

Niveles elevados de insulina a nivel tímico pueden promover una mayor eficiencia en el proceso de presentación de ésta molécula a los linfocitos T, por medio de las células presentadoras de antígenos; lo que estaría involucrado directamente con una eficiente selección negativa de los linfocitos T-insulino reactivos (173). Por lo tanto, es lógico plantear que los diferentes alelos del VNTR, que determinan una menor o mayor transcripción y expresión del gen de la insulina a nivel tímico, podrían asociarse a la presencia de DMT1A.

Un soporte claro a esta hipótesis, es el trabajo realizado en ratones donde se evalúo el grado de expresión tímica de insulina, encontrando que aquellos ratones que expresan menores niveles de esta molécula presentan linfocitos T-insulino reactivos en sangre periférica, respuesta que no se evidencia en aquellos con niveles normales de la enzima (174). Por otra parte, se ha visualizado que ratones *knockout* para el gen de la insulina (*Ins2*) (175) presentan diabetes espontánea, y aquellos en los que se estimula la sobre-expresión del gen se previene la presencia de la enfermedad (176).

Existe una asociación positiva del genotipo clase I homocigoto con DMT1A y con los niveles de la insulina en caucásicos (171, 177-179). Este hallazgo no ha sido reproducido en población asiática (180-182). Por esta discordancia, se ha planteado la existencia de otras variantes aún desconocidas que pudiesen estar en desequilibrio de ligamiento con este VNTR, hipótesis abordada recientemente por Barratt et al (183), que establecieron el genotipo para cerca de 75 polimorfismos al interior de esta región, de los cuales dos de ellos fueron planteados como candidatos para ser variante causal: el 23HphI y +1140A/C (183).

IDDM12 -CTLA4

El CTLA4 es una glicoproteína (CD152) que funciona como regulador negativo de la activación de las células

T, a través del efecto inhibidor de la transcripción de la IL-2 y de la progresión del ciclo celular (184).

El gen del CTLA-4 se ha asociado a DMT1A. Se localiza en una región que ha mostrado fuerte ligamiento (2q33) para esta enfermedad autoinmune (185,186). Se han estudiado diversos polimorfismos: el microsatélite (AT)(n), el +49A/G (exón 1), 159 C/G y -1661A/G, los cuales se han asociado con menor exposición del CTLA-4 en la membrana de la célula T, con aumento de la respuesta proliferativa linfocitaria y destrucción tisular. Además, se han asociado con anticuerpos anti-GAD (187-189). En particular el alelo +49G y el -1661G han sido consistentemente asociados con la enfermedad en diferentes grupos étnicos (188-190). El alelo largo altamente polimórfico del microsatélite (AT)(n) ha conferido riesgo significativo en población sueca (191). Igualmente, el polimorfismo C-318T, ubicado en la región promotora del gen CTLA4, se ha encontrado asociado con DMT1A: su alelo -318 C confiere riesgo mientras el alelo -318 T confiere protección (192).

Reacción inflamatoria: citoquinas y sus receptores

IL-1

La IL-1(α y β) es una citoquina con acciones proinflamatorias, implicada en la citotoxicidad de las células β del páncreas. La IL-1β desempeña un papel importante en la destrucción y muerte de éstas células (193). Los niveles de esta citoquina están en parte determinados por un polimorfismo funcional, el C+3954T ubicado en el exón 5. El alelo +3954T se ha asociado con DMT1A (194).

El receptor de la IL-1 (IL-1R1) es el principal transductor de la señal de dicha citoquina, por tanto, es indispensable para que se lleven a cabo sus funciones dentro de la respuesta inflamatoria. Los polimorfismos funcionales del IL-1R1 que han mostrado asociación con DMT1 son *Hinf*I y *Pst*I (195, 196). Sin embargo, la asociación de *Pst*I con la enfermedad no ha sido confirmada (197). Un regulador importante de la actividad de la IL-1, el antagonista del IL-1R (IL-1RA) también se ha estudiado para determinar su asociación con la DMT1A. No obstante, un estudio realizado con un VNTR (286pb) en el Intrón 2 del IL-1RA no mostró asociación con la entidad (197).

TNF

El TNF(α y β) participa en la respuesta inflamatoria y la apoptosis; y ha sido involucrado en la patogénesis de EAI como la DMT1A. En esta enfermedad, la producción del TNF está alterada (198). El alelo -383C, del SNP -383A/C, se ha asociado con alta expresión del gen del TNFR1 y con susceptibilidad a DMT1A en pacientes japoneses (199).

El polimorfismo -308G/A del TNF-α, ha mostrado asociación importante con DMT1A, en diferentes poblaciones (200,201).

IL-10

En DMT1A se encuentran niveles séricos elevados de IL-10 asociados con hiperactividad de células B e hipergammaglobulinemia. La IL-10 participa en la destrucción de las células β del páncreas (202).

Polimorfismos en la región promotora del gen (-1082G/A, -819C/T y -592C/A) no han evidenciado asociación con susceptibilidad a DMT1A en población japonesa (203), pero sí con la edad de inicio de la enfermedad (204).

IFN-γ

Un disbalance de la producción de linfocitos Th1/Th2 desempeña un rol importante en el desarrollo de la DMT1A. Por tanto niveles elevados de IFN-γ (citoquina que permite la activación de macrófagos y la diferenciación de linfocitos Th1), pueden estar influyendo en la patogénesis de la DMT1A (205). El alelo 3 del polimorfismo funcional CA-repetición ubicado en el primer intrón del gen ha sido asociado con la enfermedad en diferentes poblaciones, incluyendo la japonesa e inglesa (206,207).

IL-18

Es una potente citoquina proinflamatoria asociada con DMT1A; es producida por el macrófago e induce la síntesis de IFNγ, por tanto favorece la elevación del perfil de linfocitos Th1 que están involucrados en la respuesta inflamatoria contra los islotes pancreáticos (208). El locus donde se ubica el gen de la IL-18 (11q22) presenta ligamiento significativo con la entidad (209).

Dos SNPs, el -607 (C/A) y el -137 (G/C), ubicados en la región promotora del gen, se han estudiado en estos pacientes, evidenciando una alta frecuencia del haplotipo 1 (-607C/-137G) y por tanto susceptibilidad para la enfermedad (210). El genotipo -137GC se asocia con DMT 1A (211).

IL-12

Esta citoquina ha mostrado desempeñar un papel importante en la DMT1A, ya que induce respuestas autorreactivas en los linfocitos Th1 y participa en la destrucción tisular (212,213). Su gen se encuentra en la región 5q31, locus susceptible para DMT1A. Varios polimorfismos han sido identificados (213), de los cuales el alelo A de la variante C1159A se asoció con DMT1A en pacientes ingleses, australianos y americanos. Además, este alelo se asoció con una elevada expresión del RNAm de la citoquina (214,215). Sin embargo, un estudio multiétnico realizado en diferentes poblaciones europeas no confirmó la asociación con niveles elevados de RNAm de la IL-12 ni con la enfermedad (212,216).

Otros mecanismos

Receptor de la vitamina D (VDR)

La función biológica de la vitamina D es mediada por su receptor (VDR), el cual tiene actividad inmunomoduladora, evidenciada por la inhibición de los linfocitos T y

la producción de citoquinas. La deficiencia en la dieta de vitamina D es un factor de riesgo para desarrollar esta patología. Por tanto, el gen que codifica para este receptor es candidato por plausibilidad biológica. Su polimorfismo ha sido estudiado en pacientes con DMT1A (217).

Cuatro variantes genéticas han sido estudiadas: *Fok*I T>C, *Bsm*I A>G, *Apa*I G>T y *Taq*I C>T. Todas a excepción de *Fok*I, son funcionales (218). Los análisis de asociación genética adelantados en diferentes poblaciones han arrojado resultados variables (219-221). En españoles el alelo F de la variante FokI se asoció con DMT1A (222). El alelo B del *Bsm*I se asoció con pacientes diabéticos taiwaneses y el alelo T del Taq I ha sido reportado ser factor protector para la enfermedad en población rumana (219,223).

Enfermedades autoinmunes tiroideas (EAT)

Bajo este nombre se reúne un número de entidades que tienen en común una respuesta inmune humoral y celular dirigida contra la glándula tiroides, caracterizada por un infiltrado de linfocitos B generadores de auto-anticuerpos y la presencia de linfocitos T reactivos contra antígenos tiroideos. Dentro de estas patologías están la Enfermedad de Graves (EG), la Tiroiditis de Hashimoto (TH), la Tiroiditis Atrófica Autoinmune, la Tiroiditis Posparto, la Tiroiditis Esporádica y la Oftalmopatía asociada a tiroides (224).

Existen dos grupos de genes involucrados en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes tiroideas, aquellos que participan en la respuesta inmune y los que controlan la fisiología de la glándula. La primera aproximación al papel de la genética en el origen de las EAT se realizó en 1996 mediante un estudio familiar realizado en Túnez, que reunió cerca de 300 familiares de 60 individuos afectados por EG, y demostró que más del 40% de los pacientes tenían historia familiar de enfermedades tiroideas (225). Posteriormente se estimó que el riesgo relativo para presentar EG entre hermanos afectados era 10 a 15 veces mayor que en la población general (226,227). Estos resultados fueron corroborados por un trabajo realizado entre 8966 parejas de gemelos, donde el grado de concordancia de los gemelos monocigotos fue del 35% comparado con solo el 3% de los gemelos dicigotos. En la actualidad se presume que cerca del 79% de la predisposición a desarrollar EG es resultado de factores genéticos y únicamente el 21% se debe a factores no-genéticos, es decir a influencias ambientales y hormonales (228).

Dentro de los estudios publicados utilizando la metodología de barrido amplio del genoma, se encuentra uno realizado en población japonesa, que incluyó 123 parejas de hermanos con diagnóstico de EAT, identificando fuerte ligamiento en los locus 5q31 y 8q24 (Tabla 6) (229). Resultados similares se reportaron en población caucásica, en donde se reportó ligamiento significativo para EAT en el locus 6p, para Enfermedad de Graves en el 14q y 20q y para Tiroiditis de Hashimoto en 12q (230).

Tabla 6. Distribución de los locus que han mostrado ligamiento para el grupo de Enfermedades Tiroideas Autoinmunes.

Cromosoma	Locus	Gen candidato	Ligamiento
2	2q33	CTLA-4	4.2
5	5q31	ND	3.1
6	6p11	AITD-1	2.9
8	8q24	Tiroglobulina	2.3
8	8q24	Tiroglobulina	3.5
14	14q31	Cadena Pesada IgG, TSHR	2.1
20	20q11	CD40	3.5

ND: no dato. Modificado de referencia 231.

Alteración de la inmunoregulación, autoreactividad y tolerancia.

CTLA-4

Como se ha mencionado, esta molécula coestimuladora participa en la interacción entre las células T y células presentadoras de antígenos, y por medio de unión a proteínas expresadas por estás últimas actúa como un supresor de la actividad de los LT CD4+ (232). Por esto se ha planteado que la presencia de mutaciones en el gen que la codifica puede disminuir la expresión o función de la misma, generándose una estimulación exagerada y persistente de la actividad de los linfocitos T, lo cual contribuye al desarrollo de EAT.

Varios estudios han demostrando asociación entre el gen CTLA-4 y la EG. Los primeros encontraron asociación entre microsatélites ubicados en la región no transcrita del gen (3-UTR), (233-235) posteriormente se evaluó el polimorfismo 49G>A, encontrando asociación tanto en población caucásica (236-237) como asiática (238,239), y finalmente los estudios realizados con la variantes -318 C>T no han arrojado resultados concluyentes (240,241).

Para el caso particular de TH, los hallazgos son variables, algunos trabajos que evalúan cualquiera de las tres variantes (microsatélites, 49 A>G, -318 C>T) no han mostrado asociación (241-245), pero otros sí (235, 239, 246-247), hallazgos que ameritan evaluar a profundidad la metodología realizada en los estudios para evaluar si el poder interno era el adecuado para establecer diferencias.

Cadena pesada de la IgG

Este gen ubicado en el cromosoma 14q31, es considerado candidato para EAT y en particular para la EG, dado que esta patología se caracteriza por la producción de autoanticuerpos tipo IgG dirigidos al receptor para TSH. Los estudios iniciales reportaron asociación (248,249), sin embargo, estos resultados no fueron reproducidos en otras poblaciones (250,251).

Reacción inflamatoria: citoquinas y sus receptores

La IL-1α e IL-1β son citoquinas pleiotrópicas con efectos proinflamatorios, incluyendo la estimulación de la pro-

TABLA 7. Hallazgos de los estudios de asociación de citoquinas y sus receptores en Enfermedad de Graves.

Gen	Polimorfismo	Autor, Año, (ref)	Asociación
IL-1A	-889T>C	Hunt PJ, 2000 (252)	NO
Antagonista del receptor de IL-1 (IL1RN)	VNTR	Hunt PJ, 2000 (252) Muhlberg T, 1998 (253)	NO NO
IL-1β	+3962T>C –511C>T	Hunt PJ, 2000 (252)	NO
IL-1R	+11100T>C	Hunt PJ, 2000 (252) Chistyakov DA, 2000 (254)	NO NO
IL-4	-590C>T	Hunt PJ, 2000 (252) Nithiyananthan, 2000 (255)	Protección NO Protección
IL-4R	+1902A>G	Hunt PJ, 2000 (252)	NO
Il-6	+3247A>G	Hunt PJ, 2000 (252)	NO
IL-10	-1082A>G, -819C>T, -592C>A	Hunt PJ, 2000 (252) Ide A, 2003 (203)	NO NO
TNF	-308 G>A	Bougacha-Elleuch N, 2004 (256) Kula D, 2001 (257) Hunt PJ, 2000 (252-258)	SI SI SI

ducción de IL-2, IL-6; de igual forma la IL-4, un modulador de la respuesta inmune humoral, y la IL-6, se han encontrado elevadas en pacientes con EAT. Por esta razón sus genes han sido estudiados en EAT. Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes (Tabla 7).

CD40

Es una glicoproteína de membrana que se expresa predominantemente en las células B, aunque también se encuentra en monocitos, células dendríticas y células epiteliales; se liga con gran afinidad a la molécula accesoria CD40L, que se expresa en los linfocitos T, unión que induce activación y proliferación de la célula B. Actualmente se considera una molécula importante en la regulación de la respuesta inmune humoral, en la tolerancia de los linfocitos T y el funcionamiento de las células presentadoras de antígeno (259).

El gen que codifica para esta molécula está localizado en la región 20q11, la cual ha mostrado ligamiento para EG, con un LOD Score de 3.5. El secuenciamiento del gen reveló un polimorfismo de nucleótido simple C>T en la secuencia, está asociado con EG con RR de 1.6, para el genotipo CC (245), relación que se afianza al realizar el análisis de TdT observando la transmisión preferencial del alelo C entre los individuos afectados (260).

Genes específicos de la glándula tiroides

Receptor de TSH

Una de las características clínicas de la EG es la producción de anticuerpos contra el receptor de TSH (TSHR), por lo tanto este gen se considera como candidato en el estudio de esta enfermedad. Tres variantes del gen se han descrito, dos de ellas se localizan en el domino extracelular del receptor (D36H, P52T) y la tercera en el domino intracelular (D727E) (261). Los estudios genéticos se han enfocado en aquellas variantes ubicadas en el domino extracelular, porque teóricamente estos polimorfismos cambian la secuencia de aminoácidos expuestos para reconocimiento del sistema inmune.

Los estudios realizados en población caucásica que abordaron la variante P52T en EG, no han encontrado asociación (254, 261-264), al igual que para la variante D36H, aunque esta última ha sido poco estudiada. Sin embargo, esta tendencia se mantiene cuando se analiza la variante D727E, en la cual se describió inicialmente asociación con EG en población caucásica rusa, pero estudios posteriores no reprodujeron estos hallazgos. Hasta el momento, con ninguna variante ha sido permitido encontrar diferencias significativas que validen su uso como marcador de riesgo de enfermedad o de severidad de la misma (265-266).

Tiroglobulina (Tg)

La Tiroglobulina es la principal proteína sintetizada por la glándula tiroides y los anticuerpos dirigidos contra esta molécula son positivos en casi todas las EAT, incluyendo EG y TH. Se ha descrito, por otra parte, que la inmunización con Tg en animales induce tiroiditis autoinmune experimental, la cual es dependiente del HLA.

Para este gen se han identificado catorce variantes, cuatro intrónicas y 10 en exones, de las cuales ocho causan cambios en los aminoácidos de la proteína madura y dos son silenciosas (267). La totalidad de estas variantes fueron estudiadas en 285 pacientes con ETA y 150 controles, encontrándose asociación con esta entidad en cuatro de los polimorfismos: 2200T>G y 2334T>C, del exón 10, 3082A>G del exón 12 y 5995C>T del exón 33. Al evaluar el impacto de los diferentes haplotipos derivados, se evidenció que cualquiera de las combinaciones se encontraba significativamente asociada a la enfermedad, pero que este efecto se hace más fuerte cuando los individuos son homocigotos para la variante 5995C>T ubicada en el exón 33, en presencia de uno (heterocigoto) o dos (ho-

mocigoto) alelos mutados de las variables ubicadas en cualquiera de los exones, comportamiento que se mantiene al realizar análisis por separado para EG o TH (268).

Conclusión

Es evidente el aporte que tienen los genes no-HLA en el riesgo de desarrollar EAI. Varios de los genes analizados se comparten en más de una EAI, y otros aparecen de manera exclusiva relacionada con una patología determinada, indicando un origen inmunogenético común para varias EAI.

Desafortunadamente muchos estudios de asociación no han sido reproducibles. Esto se debe a las diferencias de los polimorfismos en función del grupo étnico, al tamaño de la muestra y demás problemas inherentes a este tipo de estudios (ver Capítulo 17). Por esta razón es muy importante estimular los estudios multicéntricos y considerar los meta-análisis en el estudio genético de las EAI.

Referencias

1. Reeves GE. Update on the immunology, diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. Intern Med J 2004; 34: 338–47
2. Tsao BP. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. Curr Opinion Rheum 2004; 16:513-21
3. Ahmad YA, Bruce LN. Genetic epidemiology systemic lupus erythematosus. Arthritis Res 2001; 3: 331-6
4. Shai R, Quismorio FP Jr, Li L, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. Hum Mol Genet 1999; 8: 639-44
5. Gaffney PM, Ortmann WA, Selby SA, et al. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses or 187 sib-pair families. Am J Hum Genet 2000; 66:547-56
6. Barreto M, Santos E, Ferreira R, et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. Eur J Hum Genet 2004;12: 620–6
7. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases -a general susceptibility gene to autoimmunity? Genes Immun 2000;1:170-84
8. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. Rheumatology (Oxford) 2001; 40: 662-77
9. Torres B, Aguilar F, Franco E, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50 :2211-5
10. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez AA. CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50: 328-9
11. Xu AP, Yin PD, Su XY. Association of CTLA-4 promoter -1722 polymorphism with systemic lupus erythematosus in Chinese. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2004; 24: 1107-12
12. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. Hum Genet 2002; 111: 452-5
13. Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. Ann Rheum Dis 2004; 63: 91-4
14. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in chinese patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2002; 21: 255-7
15. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Lack of association of interleukin-1beta gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int 2002; 21:173-5
16. Suzuki H, Matsui Y, Kashiwagi H. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 389-90
17. Danis VA, Millington M, Huang Q, Hyland V, Grennan D. Lack of association between an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and systemic lupus erythematosus. Dis Markers 1995; 12:135-9
18. Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. Genes Immun 2004 ; 5: 609-14
19. Gomez D, Correa PA, Cadena J, Gomez LM, Molina JF, Anaya JM. Th1/Th2 Cytokines in systemic lupus erythematosus. Is TNF-α protective? Semin Arthritis Rheum 2004; 33: 404-13
20. Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. Arthritis Rheum 2001; 44: 2819-27
21. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. J Rheumatol (in press)
22. Lee SH, Park SH, Min JK, et al. Decreased tumor necrosis factor-beta production in TNFB*2 homozygote: an important predisposing factor of lupus nephritis in Koreans. Lupus 1997; 6: 603-9
23. Kim TG, Kim HY, Lee SH, et al. Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNFB*2 homozygote in the Korean population. Hum Immunol 1996; 46:10- 7
24. Lee EB, Yoo JE, Lee YJ, Choi YJ, Park KS, Song YW. Tumor necrosis factor receptor 2 polymorphism in systemic lupus erythematosus: no association with disease. Hum Immunol 2001; 62: 1148-52
25. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ, Kimberly RP. Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Distal IL-10 Promoter Affect IL-10 Production and Enhance the Risk of Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol 2001; 166: 3915–22
26. Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau CS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 1090-5
27. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 1997; 24: 2314-7
28. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 1997; 49: 635-9
29. Nakashima H, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Polymorphisms within the interleukin-10 receptor cDNA gene (IL10R) in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 1999; 38: 1142-4
30. Wu MC, Huang CM, Tsai JJ, Chen HY, Tsai FJ. Polymorphisms of the interleukin-4 gene in chinese patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. Lupus 2003; 12: 21-5
31. Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, et al. Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1999; 42: 1298-300
32. Schotte H, Schluter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2001;40: 393-400
33. Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, et al. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. Genes Immun 1999;1: 45-52
34. Miyake K, Nakashima H, Akahoshi M, et al. Genetically determined interferon-gamma production influences the histological phenotype of lupus nephritis. Rheumatology (Oxford) 2002; 41: 518-24
35. Nakashima H, Inoue H, Akahoshi M, et al. The combination of polymorphisms within interferon-gamma receptor 1 and receptor 2 associated with the risk of systemic lupus erythematosus. FEBS Lett 1999; 453: 187-90
36. Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus on chromosome 2q. J Autoimmun 2000; 14: 169–78
37. Sanghera DK, Manzi S, Bontempo F, Nestlerode C, Kamboh MI. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. Hum Genet 2004; 115: 393-8
38. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet 2002; 32: 666-9
39. Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, et al. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2002; 29: 1183-8

40. Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG. Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2001; 28: 2008-11
41. Horiuchi T, Nishizaka H, Yasunaga S, et al. Association of Fas/APO-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. Rheumatology (Oxford) 1999; 38: 516-20
42. Wu J, Metz C, Xu X, et al. A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. J Immunol 2003; 170: 132-8
43. Fougerousse F, Meloni R, Roudaut C, Beckmann JS. Dinucleotide repeat polymorphism at the human poly (ADP-ribose) polymerase gene (PPOL). Nucleic Acids Res 1992; 20:1166
44. Tsao BP, Cantor RM, Grossman JM, et al. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1999; 103:1135–40
45. Criswell LA, Moser KL, Gaffney PM, et al. PARP alleles and SLE: failure to confirm association with disease susceptibility. J Clin Invest 2000; 105: 1501-2
46. Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukusawa C, Kashwazaki S. Expression and function of Fas antigen and Bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol 1994; 73: 109–14
47. Johansson C, Castillejo-López C, Johanneson B, et al. Association analysis with microsatellite and SNP markers does not support the involvement of BCL-2 in systemic lupus erythematosus in Mexican and Swedish patients and their families. Genes Immun 2000; 1: 380–5
48. Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, et al. Mannose binding lectin and FcgRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. Rheumatology 2001; 40: 1009-12
49. Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. Genes Immun 2001; 2: 99-104
50. Horiuchi T, Tsukamoto H, Morita C, et al. Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. Genes Immun 2000; 1:464-6
51. Huang YF, Wang W, Han JY, et al. Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. Eur J Immunogenet 2003; 30: 121-4
52. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP. The role of FcgammaRIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. Biomed Pharmacother 2004; 58: 286-91
53. Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME. SLE Genetics Collaboration Group. Both risk alleles for FcgammaRIIA and FcgammaRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. Genes Immun 2004; 5: 130-7
54. Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, et al. Association of Fcgamma receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. Tissue Antigens 2003; 61: 374-83
55. Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. FcgammaRIIA, FcgammaRIIIA and FcgammaRIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. Eur J Immunogenet 2002; 29: 301-6
56. Molina H. Update on complement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol 2002; 14: 492-7
57. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, et al. The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. J Immunol 2002; 169: 1570-8
58. Racila DM, Sontheimer CJ, Sheffield A, Wisnieski JJ, Racila E, Sontheimer RD. Homozygous single nucleotide polymorphism of the complement C1QA gene is associated with decreased levels of C1q in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. Lupus 2003; 12: 124-32
59. Birmingham DJ, Chen W, Liang G, Schmitt HC, Gavit K, Nagaraja HN. A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. Immunology 2003; 108: 531-8
60. Pepys MB, Lanham JG, de Beer FC. C-reactive protein in SLE. Clin Rheum Dis 1982; 8: 91-103
61. Gabay C, Roux-Lombart P, de Moerloose P, Dayer J-M, Vischer T, Guerne P-A. Absence of correlation between inerleukin 6 and C-reactive protein blood levels in systemic lupus erythematosus compared with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1993; 20:815-21
62. Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, Roberton CA, Whittaker J, Meeks J. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet 2004;13: 137-47
63. Serrano NC, Páez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2004; 31: 2163-8
64. Lopez-Nevot MA, Ramal L, Jimenez-Alonso J, Martin J. The inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism does not confer susceptibility to systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) 2003; 42: 113-6
65. Oates JC, Levesque MC, Hobbs MR, et al. Nitric oxide synthase 2 promoter polymorphisms and systemic lupus erythematosus in african-americans. J Rheumatol 2003; 30: 60-7
66. Douglas G, Reilly C, Dooley MA, Page G, Cooper G, Gilkeson G. Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2004; 31: 1756-62
67. Parsa A, Peden E, Lum RF, et al. Association of angiotensin-converting enzyme polymorphisms with systemic lupus erythematosus and nephritis: analysis of 644 SLE families. Genes Immun 2002; 3 Suppl1:S42-S6
68. Prkacin I, Novak B, Sertic J, Mrzljak A. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with systemic lupus. Acta Med Croatica 2001; 55: 73-6
69. Pullmann R Jr, Lukac J, Skerenova M, V et al. Association between systemic lupus erythematosus and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene. Clin Exp Rheumatol 1999; 17: 593-6
70. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. Br J Rheumatol 1993; 32: 903–7
71. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. Cell 1996; 85: 311–8
72. Cornelis F, Faure S, Martinez M, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:10:46–50
73. Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 10049–53
74. Fisher SA, Lanchbury JS, Lewis CM. Meta-Analysis of Four Rheumatoid Arthritis Genome-Wide Linkage Studies. Arthritis Rheum 2003; 48: 1200–6
75. Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1995; 54: 601–3
76. Cameron PU, Tabarias HA, Pulendran B, Robinson W, Dawkins RL. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1997; 49: 74–8
77. Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D, et al. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43: 1366–70
78. Shibue T, Tsuchiya N, Komata T. Tumor necrosis factor alpha 50-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000; 43:753–7
79. Seki N, Kamizono S, Yamada A, et al. Polymorphisms in the 50-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1999; 54: 194–7
80. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, et al. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? Br J Rheumatol 1997; 36: 516–21
81. van Krugten MV, Huizinga TW, Kaijzel EL, et al. Association of the TNF +489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis. Genes Immun 1999;1: 91–6
82. Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2002; 29 :29–33
83. Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MC, Thomson G, Criswell LA. Tumor necrosis factor a microsatellite polymorphism is associated with rheumatoid arthritis severity through an interaction with the HLA-DRB1 shared epitope. Arthritis Rheum 1999; 42 : 438–42
84. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, et al. IL-10 Gene Promoter Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis. Scand J Rheumatol 1998; 27: 142-5
85. Coakley G, Mok CC, Hajeer AH, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. Br J Rheumatol 1998; 37: 988-91
86. Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, et al. Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. J Rheumatol 2004; 31: 422-5
87. MacKay K, Milicic A, Lee D, et al. Rheumatoid arthritis susceptibility and interleukin 10: a study of two ethnically diverse populations. Rheumatology (Oxford) 2003; 42: 149-53

88. Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, et al. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. Lancet 1998; 352: 1282-3
89. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. J Rheumatol 2002 ; 29: 212-9
90. Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. Genes Immun 2001; 2: 222-8
91. Fedetz M, Matesanz F, Caliz R, Ferrer MA, Collado MD, Alcina A, Martin J. Lack of association between -384 and 114 IL-2 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2003; 30: 435-7
92. Buchs N, Silvestri T, di Giovine FS, Chabaud M, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. Rheumatology (Oxford) 2000; 39: 1126-31
93. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1999; 42: 1093-100
94. Pascual M, Nieto A, Mataran L, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martin J. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. Genes Immun 2000; 1: 338-40
95. Crilly A, Bartlett JM, White A, Stirling D, Capell H, Madhok R. Investigation of novel polymorphisms within the 3' region of the IL-6 gene in patients with rheumatoid arthritis using Genescan analysis. Cytokine 2001; 13: 109-12
96. Barton A, Jury F, Eyre S, et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2004; 50: 748-52
97. Lee CS, Lee YJ, Liu HF, Su CH, Chang SC, Wang BR. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese. Clin Rheumatol 2003;22:221-4
98. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. No association of polymorphisms of the CTLA-4 exon 1(+49) and promoter(-318) genes with rheumatoid arthritis in the Korean population. Scand J Rheumatol 2002; 31: 266-70
99. Milicic A, Brown MA, Wordsworth BP. Polymorphism in codon 17 of the CTLA-4 gene (+49 A/G) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasians. Tissue Antigens 2001; 58: 50-4
100. Barton A, Myerscough A, John S, Gonzalez-Gay M, Ollier W, Worthington J. A single nucleotide polymorphism in exon 1 of cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 (CTLA-4) is not associated with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2000; 39: 63-6
101. Matsushita M, Tsuchiya N, Shiota M, et al. Lack of a strong association of CTLA-4 exon 1 polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese: an association study using a novel variation screening method. Tissue Antigens 1999; 54: 578-84
102. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, Garcia A, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1999; 53: 296-300
103. Morgan AW, Keyte VH, Babbage SJ, et al. FcgammaRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study. Rheumatology (Oxford) 2003; 42: 528-33
104. Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, et al. Fcgamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. Arthritis Rheum 2000; 43: 2328-34
105. Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, et al. FC gamma RIIa polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 2002; 20: 841-4
106. Martinez A, Pascual M, Pascual-Salcedo D, Balsa A, Martin J, de la Concha EG. Genetic polymorphisms in Spanish rheumatoid arthritis patients: an association and linkage study. Genes Immun 2003;4: 117-21
107. Milicic A, Misra R, Agrawal S, Aggarwal A, Brown MA, Wordsworth BP. The F158V polymorphism in FcgammaRIIIA shows disparate associations with rheumatoid arthritis in two genetically distinct populations. Ann Rheum Dis 2002; 61: 1021-3
108. Zhang SL, Chabod J, Penfornis A, et al. TAP1 and TAP2 gene polymorphism in rheumatoid arthritis in a population in eastern France. Eur J Immunogenet 2002; 29: 241-9
109. Yu MC, Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of TAP2 gene polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 2004; 23: 35-9
110. Zhou Z, Menard HA. Autoantigenic posttranslational modifications of proteins: does it apply to rheumatoid arthritis? Curr Opin Rheumatol 2002; 14: 250–3
111. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinatin genzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet 2003; 34: 395–402
112. Barton A, Bowes J, Eyre S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. Arthritis Rheum 2004; 50: 1117-21
113. Ip WK, Lau YL, Chan SY, et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. Arthritis Rheum. 2000; 43: 1679-87
114. Jacobsen S, Madsen HO, Klarlund M, et al. TIRA Group. The influence of mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. TIRA Group. J Rheumatol 2001; 28: 935-42
115. Stanworth SJ, Donn RP, Hassall A, Dawes P, Ollier W, Snowden N. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol 1998; 37:186-8
116. Barton A, Platt H, Salway F, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin (MBL) gene are not associated with radiographic erosions in rheumatoid or inflammatory polyarthritis. J Rheumatol 2004; 31: 442-7
117. Hafler D. Multiple sclerosis. J Clin Invest 2004;113: 788–94
118. Dyment D, Ebers G, Sadovnick A. Genetics of multiple sclerosis. Lancet Neurol 2004; 3: 104–10
119. Walsh E, Guschwan-McMahon S, Daly M , Hafler D, Rioux J. Genetic analysis of multiple sclerosis. J Autoimmun 2003; 21:111–6
120. Compston A, Sawcer S. Genetic analysis of multiple sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 2002; 2: 259–66
121. Sotgiu S, Pugliatti M, Fois L, et al. Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. Neurobiol Dis 2004; 17: 131–43
122. Ligers A, Xu C, Saarinen S, Hillert J, Olerup O. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1999; 97:182-90
123. Harbo HF, Celius EG, Vartdal F, Spurkland A. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. Tissue Antigens 1999; 53: 106-10
124. Bilinska M, Frydecka I, Noga L, et al. Progression of multiple sclerosis is associated with exon 1 CTLA-4 gene polymorphism. Acta Neurol Scand 2004; 110: 67-71
125. Kantarci OH, Hebrink DD, Achenbach SJ, et al. CTLA4 is associated with susceptibility to multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2003; 134: 133-41.
126. Mann CL, Davies MB, Stevenson VL, et al. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. J Neuroimmunol 2002; 129: 197-204
127. Luomala M, Lehtimaki T, Elovaara I, et al. A study of interleukin-1 cluster genes in susceptibility to and severity of multiple sclerosis. J Neurol Sci 2001; 185: 123-7
128. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. J Neuroimmunol 2001; 118: 295-9
129. de Jong BA, Huizinga TW, Bollen EL, et al. Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002; 126:172-9
130. Drulovic J, Popadic D, Mesaros S, et al. Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha -308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis. Eur Neurol 2003; 50:25-9
131. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, et al. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. J Neuroimmunol 1998; 84: 198-206
132. Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Rubio A, et al. Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. Neurology 1999; 53: 1361-3
133. Martínez A, Rubio A, Urcelay E, et al. TBF-376A marks susceptibility to MS in the Spanish population. Neurology 2004; 62:809-10
134. Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13: 403-12
135. Myhr KM, Vagnes KS, Maroy TH, Aarseth JH, Nyland HI, Vedeler CA. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 2002; 202: 93-7
136. Martinez Doncel A, Rubio A, Arroyo R, et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2002; 131: 168-72
137. de Jong BA, Westendorp RG, Eskdale J, Uitdehaag BM, Huizinga TW. Frequency of functional interleukin-10 promoter polymorphism is different between relapse-onset and primary progressive multiple sclerosis. Hum Immunol 2002; 63: 281-5
138. Schmidt S, Papassotiropoulos A, Sotgiu S, et al. Investigation of a genetic variation of a variable number tandem repeat polymorphism of interleukin-6 gene in patients with multiple sclerosis. J Neurol 2003; 250: 607-11

139. Fedetz M, Matesanz F, Pascual M, et al. The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis. J Neurol Sci 2001; 190: 69-72
140. Vandenbroeck K, Fiten P, Ronsse I, et al. High-resolution analysis of IL-6 minisatellite polymorphism in Sardinian multiple sclerosis: effect on course and onset of disease. Genes Immun 2000; 1: 460-3
141. Gomez-Lira M, Moretto G, Bonamini D, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein polymorphisms and multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002; 133: 241-3
142. Ohlenbusch A, Pohl D, Hanefeld F. Myelin oligodendrocyte gene polymorphisms and childhood multiple sclerosis. Pediatr Res 2002; 52: 175-9
143. Roth MP, Dolbois L, Borot N, Pontarotti P, Clanet M, Coppin H. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene polymorphisms and multiple sclerosis: no evidence of disease association with MOG. J Neuroimmunol 1995; 61:117–22
144. Rodriguez D, Della Gaspera B, Zalc B, et al. Identification of a Val 145 Ile substitution in the human myelin oligodendrocyte glycoprotein: lack of association with multiple sclerosis. Mult Scler 1997; 3: 377–81
145. D'Alfonso S, Mellai M, Giordano M, et al. Identification of single nucleotide variations in the coding and regulatory regions of the myelin-associated glycoprotein gene and study of their association with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002; 126: 196-204
146. Moller JR, Yanagisawa K, Brady RO, Tourtellotte WW, Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis lesions: a quantitative and qualitative analysis. Ann Neurol 1987; 22: 469–74
147. Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P. Genetics of multiple sclerosis: linkage and association studies. Am. J Pharmacogenomics 2002; 2: 37–58
148. Tienari PJ, Kuokkanen S, Pastinen T, et al. Golli-MPB gene in multiple sclerosis susceptibility. J Neuroimmunol 1998; 81: 158–67
149. Boylan KB, Takahashi N, Paty DW, et al. DNA length polymorphism 5' to the myelin basic protein gene is associated with multiple sclerosis.Ann Neurol 1990; 27: 291–7
150. Eoli M, Pandolfo M, Milanese C, Gasparini P, Salmaggi A, Zeviani M. The myelin basic protein gene is not a major susceptibility locus for multiple sclerosis in Italian patients. J Neurol 1994; 241: 615–9
151. Price SE, Sharpe G, Boots A, et al. Role of myelin basic protein and proteolipid protein genes in multiple sclerosis: single strand conformation polymorphism analysis of the human sequences. Neuropathol Appl Neurobiol 1997; 23: 457–67
152. Cocco E, Mancosu C, Fadda E, et al. Lack of evidence for a role of the myelin basic protein gene in multiple sclerosis susceptibility in Sardinian patients. J Neurol 2002; 249: 1552-5
153. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today 1995; 6: 569-74
154. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Miyagishi R, Yabe I, Tashiro K. An examination of the Apo-1/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. BMC Neurol 2002; 2: 8
155. Kantarci OH, Hebrink DD, Achenbach SJ, et al. CD95 polymorphisms are associated with susceptibility to MS in women. A population-based study of CD95 and CD95L in MS. J Neuroimmunol 2004; 146: 162-70
156. van Veen T, Kalkers NF, Crusius JB, et al. The FAS-670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2002; 128: 95-100
157. Barcellos LF, Begovich AB, Reynolds RL, et al. Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. Ann Neurol 2004; 55: 793-800
158. Tajouri L, Martin V, Ovcaric M, et al. Investigation of a inducible nitric oxide synthase (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. Brain Res Bull 2004; 64: 9-13
159. Tajouri L, Ferreira L, Ovcaric M, et al. Investigation of a neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) polymorphism in a multiple sclerosis population. J Neurol Sci 2004; 218: 25-8
160. Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, et al. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve, J. Clin Invest 1989; 83: 1015-31
161. Barcellos LF, Oksenberg JR, Green AJ, et al. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. Brain 2002; 125: 150–8
162. Evangelou N, Jackson M, Beeson D, Palace J. Association of the APO E epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; 67: 203-5
163. Ballerini C, Campani D, Rombola G, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism to clinical heterogeneity of multiple sclerosis. Neurosci Lett 2000; 296: 174-6
164. Schmidt S, Barcellos LF, DeSombre K, et al. Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis. Am J Hum Genet 2002; 70: 708-17
165. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, et al. Insulin antibodies insulin-dependent diabetics before insulin treatment. Science 1983; 222: 1337–9
166. Kordonouri O, Klinghammer A, Lang EB, Gruters- Kieslich A, Grabert M, Holl RW. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: a multicenter survey. Diabetes Care 2002;25:1346 –50
167. Levin L, Tomer Y. The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility. Autoimmunity Reviews 2003; 2: 377–86
168. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. Genes Immun 2002; 3: 235-49
169. Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. Endocrin Metabol Clin N Am 2004; 33: 1-16
170. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. Am J Hum Genet 1996; 59:1134-48
171. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. Nat Genet 1995; 9: 284–92
172. Pugliese A, Zeller M, Fernandez AJ, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 1997; 15: 293-7
173. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 1997; 15: 289-92
174. Thebault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. J Clin Invest 2003; 111: 851-7
175. French MB, Allison J, Cram DS, et al. Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. Diabetes 1997; 46: 34-9
176. Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. Diabetes 2002; 51: 1383-90
177. Owerbach D, Gabbay KH. Linkage of the VNTR/insulin-gene and type I diabetes mellitus: increased gene sharing in affected sibling pairs. Am J Hum Genet 1994; 54: 909-12
178. Kawaguchi Y, Ikegami H, Shen GQ, et al. Insulin gene region contributes to genetic susceptibility to, but may not to low incidence of, insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. Biochem Biophys Res Commun 1997; 233: 283-7
179. Perez De Nanclares G, Bilbao JR, Calvo B, Vitoria JC, Vazquez F, Castano L. 5'-Insulin gene VNTR polymorphism is specific for type 1 diabetes: no association with celiac or Addison's disease. Ann N Y Acad Sci 2003; 1005: 319-23
180. Undlien DE, Hamaguchi K, Kimura A, et al. Ronningen KS. IDDM susceptibility associated with polymorphisms in the insulin gene region. A study of blacks, Caucasians and orientals. Diabetologia 1994; 37: 745-9
181. Matsumoto C, Awata T, Iwamoto Y, Kuzuya T, Saito T, Kanazawa Y. Lack of association of the insulin gene region with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. Diabetologia 1994; 37: 210-3
182. Walter M, Albert E, Conrad M, et al. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity. Diabetologia. 2003; 46: 712-20
183. Barratt BJ, Payne F, Lowe CE, Hermann R, Healy BC, Harold D. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. Diabetes 2004; 53: 1884-9
184. Eggena MP, Walker LS, Nagabhushanam V, Barron L, Chodos A, Abbas AK. Cooperative roles of CTLA-4 and regulatory T cells in tolerance to an islet cell antigen. J Exp Med 2004; 199: 1725-30
185. Turpeinen H, Laine AP, Hermann R, et al. A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. Eur J Immunogenet 2003; 30: 289-93
186. Krokowski M, Bodalski J, Bratek A, Machejko P, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland. Diabetes Metab 1998; 24: 241-3
187. Osei-Hyiaman D, Hou L, Zhiyin R, et al. Association of a novel point mutation (C159G) of the CTLA4 gene with type 1 diabetes in West Africans but not in Chinese. Diabetes 2001; 50: 2169-71
188. Kikuoka N, Sugihara S, Yanagawa T, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene polymorphism confers susceptibility to type 1 diabetes in Japanese children: analysis of association with HLA genotypes and autoantibodies. Clin Endocrinol 2001; 55: 597-603
189. Lee YJ, Huang FY, Lo FS, et al. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. Clin Endocrinol 2000; 52: 153-7
190. Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, et al. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. Genes Immun 2003; 4: 132-7

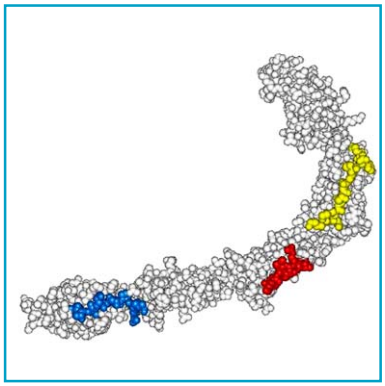
191. Lowe RM, Graham J, Sund G, et al. The length of the CTLA-4 microsatellite (AT)N-repeat affects the risk for type 1 diabetes. Diabetes Incidence in Sweden Study Group. Autoimmunity 2000; 32: 173-80
192. Lee YJ, Lo FS, Shu SG, et al. The promoter region of the CTLA4 gene is associated with type 1 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab 2001; 14: 383-8
193. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. Diabetologia 1996; 39: 1005–29
194. Krikovsky D, Vasarhelyi B, Treszl A, et al. Genetic polymorphism of interleukin-1beta is associated with risk of type 1 diabetes mellitus in children. Eur J Pediatr 2002; 161: 507-8
195. Bergholdt R, Larsen ZM, Andersen NA, et al. Characterization of new polymorphisms in the 5' UTR of the human interleukin-1 receptor type 1 (IL1R1) gene: linkage to type 1 diabetes and correlation to IL-1RI plasma level. Genes Immun 2000; 1: 495-500
196. Bergholdt R, Karlsen AE, Johannesen J, et al. Characterization of polymorphisms of an interleukin-1 receptor type 1 gene (IL1RI) promoter region (P2) and their relation to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Cytokine 1995; 7: 727–32
197. Kristiansen OP, Pociot F, Johannesen J, et al. Linkage disequilibrium testing of four interleukin-1 gene-cluster polymorphisms in Danish multiplex families with insulin-dependent diabetes mellitus. Cytokine 2000; 12: 171–5
198. Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. Curr Opin Immunol 2000;12: 719–24
199. Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. Hum Immunol 2003; 64: 302-9
200. Krikovszky D, Vasarhelyi B, Toth-Heyn P, Korner A, Tulassay T, Madacsy L. Association between G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene and 24-hour ambulatory blood pressure values in type 1 diabetic adolescents. Clin Genet 2002; 62: 474-7
201. Heijmans BT, Westendorp RG, Droog S, Kluft C, Knook DL, Slagboom PE. Association of the tumour necrosis factor alpha -308G/A polymorphism with the risk of diabetes in an elderly population-based cohort. Genes Immun 2002; 3: 225-8
202. Wogensen L, Lee MS, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of b cells in nonobese diabetic mice. J Exp Med 1994; 179: 1379-84
203. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, et al. Interleukin-10 gene promoter region polymorphisms in patients with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease. Ann N Y Acad Sci 2003; 1005: 344-7
204. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, et al. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. Hum Immunol 2002; 63: 690-5
205. Chang I, Cho N, Kim S, et al. Role of calcium in pancreatic islet cell death by IFN-gamma/TNF-alpha. J Immunol 2004; 172: 7008-14
206. Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. J Interferon Cytokine Res 2000; 20: 187-90
207. Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y. Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. Diabetologia 1994; 37: 1159-62
208. Frigerio S, Hollander GA, Zumsteg U. Functional IL-18 Is produced by primary pancreatic mouse islets and NIT-1 beta cells and participates in the progression towards destructive insulitis. Horm Res 2002; 57: 94-104
209. Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. Genomics 1998; 51: 161-3
210. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, et al. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. J Autoimmun 2004; 22: 73-8
211. Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. Diabetes 2002; 51: 3347-9
212. Bergholdt R, Ghandil P, Johannesen J, et al. Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes. J Med Genet 2004; 41:e39
213. Huang D, Cancilla MR, Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. Genes Immun 2000; 1: 515–20
214. Hall MA, McGlinn E, Coakley G, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. Genes Immun 2000;1: 219–24
215. Morahan G, Huang DX, Ymer SI, et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nature Genet 2001; 27: 218–21
216. Davoodi-Semiromi A, Yang JJ, She JX. IL-12p40 is associated with type 1 diabetes in Caucasian-American families. Diabetes 2002; 51: 2334-6
217. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. Physiol Rev 1998;7:1193 –231
218. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. Epidemiol Rev 2000; 22: 203–17
219. Guja C, Marshall S, Welsh K, et al. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. J Cell Mol Med 2002; 6: 75–81
220. Fassbender WJ, Goertz B, Weismuller K, et al. VDR gene polymorphisms are overrepresented in German patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. Horm Metab Res 2002; 34: 330-7
221. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, et al. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. Diabetes2004; 53: 2709-12
222. Marti G, Audi L, Esteban C, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish populations. Med Clin (Barc) 2004; 123: 286-90
223. Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. Clin Endocrinol 2000; 52: 575–80
224. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. Clin Endocrinol (Oxf) 2002; 7: 481–93
225. Maalej A, Makni H, Ayadi F, et al. A full genome screening in a large Tunisian family affected with thyroid autoimmune disorders. Genes Immun 2001; 2, 71–5
226. Stenszky V, Kozma L, Balazs C, Rochlitz S, Bear JC, Farid NR. The genetics of Graves' disease: HLA and disease susceptibility. J Clin Endocrinol Metab 1985; 61: 735–40
227. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. Thyroid 1998; 8: 627–34
228. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 930–4
229. Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31–q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23–q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. Hum Mol Genet 2001; 10: 1379–86
230. Barbesino G, Tomer J, Concepción E, Davies TF, Greenberg DA. Linkage Analysis of Candidate Genes in Autoimmune Thyroid Disease: 1. Selected Immunoregulatory Genes. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1580–84
231. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. Mapping the Major Susceptibility Loci for Familial Graves' and Hashimoto's Diseases: Evidence for Genetic Heterogeneity and Gene Interactions. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 4656–64
232. Reiser H, Stadecker MJ. Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. N Engl J Med 1996; 335: 1369–77
233. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:41–5
234. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Hum Mol Genet 1996; 5: 1075–80
235. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. Clin Endocrinol (Oxf) 1997; 46: 551–4
236. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 143–6
237. Vaidya B, Imrie H, Perros P, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism confers susceptibility to thyroid associated orbitopathy. Lancet 1999; 354:743–4
238. Yanagawa T, Taniyama M, Enomoto S, et al. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. Thyroid 1997;7: 843–846
239. Akamizu T, Sale MM, Rich SS, et al. Association of autoimmune thyroid disease with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in Japanese patients. Thyroid 2000; 10: 851–8
240. Braun J, Donner H, Siegmund T, Walfish PG, Usadel KH, Badenhoop K. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. Tissue Antigens 1998; 51: 563–6
241. Heward JM, Allahabadia A, Carr-Smith J, et al. No evidence for allelic association of human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies. Clin Endocrinol (Oxf) 1998; 49: 331–4
242. Park YJ, Chung HK, Park DJ, et al. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. Thyroid 2000; 10: 453–9

243. Sale MM, Akamizu T, Howard TD, et al. Association of autoimmune thyroid disease with a microsatellite marker for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in a Japanese population. Proc Assoc Am Physicians 1997; 109:453–61
244. Petrone A, Giorgi G, Mesturino CA, et al. Association of DRB1*04-DQB1*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. Thyroid 2001; 11: 171–5
245. Maalej A, Bougacha N, Rebai A, Bellassouad M, Ayadi-Makni F, Abid M. Lack of linkage and association between autoimmune thyroid diseases and the CTLA-4 gene in a large Tunisian family. Hum Immunol 2001; 62: 1245-50
246. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA, Gough SC. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. Thyroid 2002;12:3–6
247. Donner H, Braun J, Seidl C, et al. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82 :4130–2
248. Nakao Y, Matsumoto H, Miyazaki T, et al. IgG heavy chain allotypes (Gm) in atrophic and goitrous thyroiditis. Clin Exp Immunol 1980; 42: 20–6
249. Uno H, Sasazuki H, Tamia H, Matsumoto H. Two major genes, linked to HLA and Gm, control susceptibility to Graves' disease. Nature 1981; 292: 768–70
250. Roman SH, Hubbard M, Rubinstein P. Failure to confirm standard HLA and Gm immunogenetic typing as a predictor of familial autoimmune thyroid disease. Program of the 71st Annual Meeting of The Endocrine Society, Seattle, WA, 1989 (Abstract)
251. Fakhfakh F, Maalej A, Makni H, et al. Analysis of immunoglobulin VH and TCR c_a polymorphisms in a large family with thyroid autoimmune disorder. Exp Clin Immunogenet 1999; 16: 185–91
252. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1984-8
253. Muhlberg T, Kirchberger M, Spitzweg C, Herrmann F, Heberling HJ, Heufelder AE. Lack of association of Graves' disease with the A2 allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene in a white European population. Eur J Endocrinol 1998; 138: 686-90
254. Chistyakov DA, Savost'anov KV, Turakulov RI, et al. Complex association analysis of graves disease using a set of polymorphic markers. Mol Genet Metab 2000; 70: 214-8
255. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. A heterozygous deletion of the autoimmune regulator (AIRE1) gene, autoimmune thyroid disease, and type 1 diabetes: no evidence for association. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1320-2
256. Bougacha-Elleuch N, Rebai A, Mnif M, et al. Analysis of MHC genes in a Tunisian isolate with autoimmune thyroid diseases: implication of TNF -308 gene polymorphism. J Autoimmun 2004; 23: 75-80
257. Kula D, Jurecka-Tuleja B, Gubala E, Krawczyk A, Szpak S, Jarzab M. Association of polymorphism of LTalpha and TNF genes with Graves' disease. Folia Histochem Cytobiol. 2001; 39 Suppl 2:77-8 (Abstract)
258. Houston FA, Wilson V, Jennings CE, et al. Role of the CD40 locus in Graves' disease. Thyroid 2004;14:506-9
259. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. Immunol Today 1994; 15:406–11
260. Tomer Y, Concepcion E, Greenberg DA. A C/T single nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. Thyroid 2002; 12:1129–35
261. Kotsa KD, Watson PF, Weetman AP. No association between a thyrotropin receptor gene polymorphism and Graves' disease in the female population. Thyroid 1997; 7:31–3
262. Allahabadia A, Heward JM, Mijovic C, et al. Lack of association between polymorphism of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease in United Kingdom and Hong Kong Chinese patients: case control and family-based studies. Thyroid 1998; 8: 777–80
263. Simanainen J, Kinch A, Westermark K, et al. Analysis of mutations in exon 1 of the human thyrotropin receptor gene: high frequency of the D36H and P52T polymorphic variants. Thyroid 1999; 9:7–11
264. Kaczur V, Takacs M, Szalai C, et al. Analysis of the genetic variability of the 1st (CCC/ACC, P52T) and the 10th exons (bp 1012–1704) of the TSH receptor gene in Graves' disease. Eur J Immunogenet 2000; 27: 17–23
265. Muhlberg T, Herrmann K, Joba W, Kirchberger M, Heberling HJ, Heufelder AE. Lack of association of nonautoimmune hyperfunctioning thyroid disorders and a germline polymorphism of codon 727 of the human thyrotropin receptor in a European Caucasian population. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2640–3
266. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion ES, Tomer Y. A germline single nucleotide polymorphism at the intracellular domain of the human thyrotropin receptor does not have a major effect on the development of Graves' disease. Thyroid 2002; 12:1079–83
267. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a thyroglobulin gene polymorphism with Hashimoto's thyroiditis in the Japanese population. Clin Endocrinol (Oxf) 2004; 61: 263-8
268. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R, Tomer Y. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 15119-24

20

AUTOINMUNIDAD E INFECCIÓN: HIPÓTESIS DEL MIMETISMO MOLECULAR

Ricard Cervera
José A. Gómez-Puerta
Miri Blank
Ronald Asherson
Yehuda Shoenfeld



Contenido

Síndrome antifosfolipídico
Origen de los anticuerpos anti-β2GPI en el plasma
Infección y anticuerpos antifosfolipídicos
SAF catastrófico e infecciones
Etiología infecciosa de los anticuerpos anti-β2GPI
Actividad dual de los anticuerpos anti-β2GPI frente a las infecciones
Virus de la vacuna
Interrelación entre el veb-β2GPI y los anticuerpos anti- β2GPI
Compromiso de los anticuerpos anti-β2GPI en el control de la activación del complemento
Anticuerpos anti-β2GPI y el cofactor de la proteína de membrana CD46
Relación con la inmunidad innata
Consideraciones terapéuticas

El mimetismo molecular es uno de los mecanismos principales por el cual el síndrome antifosfolipídico (SAF) experimental puede ser desencadenado tras la presencia de patógenos. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, el concepto de mimetismo molecular permanece como una hipótesis viable para resolver algunas preguntas y enfoques, para descifrar y entender los mecanismos patogénicos implicados y para diseñar nuevas estrategias terapéuticas. Estudios en modelos experimentales de SAF y con péptidos sintéticos que comparten epítopes entre bacterias y virus con la mlécula β2GPI demuestran la existencia del mimetismo molecular entre los patógenos y los autoantígenos en el SAF. Nosotros especulamos que un antígeno con mimetismo molecular, similar en sólo un epítope, puede iniciar una respuesta inmunitaria mediante reacción cruzada hacia el epítope, que posteriormente dará como resultado el reconocimiento de numerosos epítopes de la β2GPI en el huésped. El mimetismo molecular podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales se rompe la tolerancia y se desencadenan respuestas autoinmunes, si bien la sola presencia de los virus o las bacterias no necesariamente produce enfermedad. Un SAF "florido" sólo aparecerá si existe una determinada predisposición genética.

Introducción

Existe un consenso general en que las enfermedades autoinmunes tienen una etiología multifactorial y dependen tanto de factores genéticos como de factores ambientales. Los agentes bacterianos o los virus pueden inducir enfermedades autoinmunes por múltiples mecanismos (1-5). Así, proteínas de ciertos agentes infecciosos pueden actuar como activadores policlonales sobre un subtipo específico de linfocitos. Ciertos virus pueden, de manera selectiva, infectar o destruir a subtipos de linfocitos T y producir un desequilibrio en la respuesta autoinmune. En otras circunstancias, los agentes infecciosos pueden activar citocinas dependientes de la respuesta Th1, llevando a un aumento en la expresión de moléculas como las glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), como también a una activación de moléculas co-estimuladoras. Se ha observado, asimismo, que ciertos agentes microbianos pueden codificar superantígenos que, de manera selectiva, activan subtipos de linfocitos T. Ciertos microorganismos, a su vez, son capaces de activar la liberación de citocinas y quimocinas, que actúan como factores de crecimiento, diferenciación y quimiotácticos para diferentes poblaciones Th, regulando la expresión de moléculas del CMH de clase I y clase II (1-5).

El sistema de inmunidad normal tolera a una serie de moléculas de las cuales está conformado el organismo. Sin embargo, entre los principales antígenos reconocidos en las infecciones bacterianas, víricas y parasitarias existen proteínas, con una secuencia o una conformación similar a las moléculas del huésped. A esta respuesta anormal a dichos antígenos se le conoce como *mimetismo molecular*. La similitud antigénica a las secuencias de cadenas de aminoácidos o a la conformación estructural entre los antígenos de los agentes infecciosos y los tejidos del huésped puede activar una respuesta contra las regiones específicas que se comparten. Como resultado, se pierde la autotolerancia a los antígenos propios y comienza una respuesta inmunológica patógeno-específica que genera una reacción cruzada contra las estructuras del huésped, causando daño tisular y enfermedad. El papel del mimetismo molecular en la patogenia de las enfermedades autoinmunes se ha demostrado recientemente en modelos animales, como la encefalomielitis alérgica, la miocarditis experimental y la uveitis-queratitis experimental autoinmune (5-10). Recientemente, dos grupos de investigadores encontraron mimetismo molecular entre patógenos comunes y la β2-glicoproteína-I (β2GPI), la cual es una de las principales moléculas implicadas en la patogenia del síndrome antifosfolipídico (SAF) (11-14).

Síndrome Antifosfolipídico (SAF)

El síndrome antifosfolipídico se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (AAF), como los anticuerpos anticardiolipina (AAC), que se unen a moléculas de fosfolípidos principalmente a través de la ß2GPI, y el anticoagulante lúpico (AL), que están relacionados con el desarrollo de fenómenos tromboembólicos, pérdidas fetales recurrentes, trombocitopenia y alteraciones neurológicas y cardiacas, entre otras manifestaciones clínicas (15-21).

La molécula humana de la β2GPI es una glicoproteína de membrana de adhesión, de 326 aminoácidos, presente en el plasma sanguíneo a concentraciones entre 150 a 300 ug/ml (22,23). La β2GPI exhibe varias propiedades *in vitro* que la definen como un anticoagulante (p.ej. inhibición de la actividad de la protrombinasa, agregación plaquetaria inducida por ADP y producción de factor IX plaquetario) (24,25). Participa además en la depuración de cuerpos apoptóticos de la circulación (26). Se ha encontrado que tiene propiedades inmunogénicas *in vivo*. La inmunización de ratones BALB/c, PL/J o conejos de Nueva Zelanda blancos con β2GPI genera anticuerpos anti-β2 GPI (27-30). Los ratones inmunizados con β2GPI desarrollan títulos elevados de AAC, asociados con un alto porcentaje de reabsorciones fetales (el equivalente a pérdidas fetales en el SAF humano), trombocitopenia y prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activado (TTPA), lo cual indica la presencia de AL (29). Se ha observado además una aceleración de las manifestaciones del SAF en ratones MRL/lpr (un modelo murino de SAF con base genética) inmunizados con β2GPI (31). Asimismo, se ha prevenido la aparición de SAF en ratones alimentados por vía oral con β2GPI en los cuales se indujo tolerancia (32).

Los anticuerpos anti- β2GPI ejercen un efecto patogénico directo al interferir con las reacciones homeostáticas que ocurren en la superficie de los monocitos, las plaquetas y las células endoteliales vasculares (33-35). Se ha encontrado que la activación de los monocitos por los anticuepos anti-β2GPI genera la liberación del factor tisular (34-35) y la activación de las células endoteliales, las cuales inducen la expresión de moléculas de adhesión, como la E-selectina, el ICAM-I, el VCAM-I y el NFkB (37-39). La transferencia pasiva a ratones previamente no inmunizados de estos anticuerpos o de anticuerpos contra β2GPI por péptidos sintéticos homólogos a bacterias comunes da como resultado la inducción de un modelo experimental de SAF (38,42,43). El intercambio entre las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos patogénicos anti- β2GPI y la cadena sencilla Fv de los anticuerpos no patogénicos ha mostrado que el segmento patogénico de la molécula de anti- ß2GPI se encuentra localizado en el CDR3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina (44). Nuestro grupo (38) y otros grupos de investigadores (45-53) han descrito que los epítopes diana para la unión de los anti- β2GPI a la molécula β2GPI están diseminados en diferentes lugares a lo largo de los 5 dominios de la molécula. Varios pacientes con SAF presentan un panel ampliamente diferenciado contra anticuerpos anti-β2GPI dirigidos contra los diferentes epítopes (38,54).

Origen de los anticuerpos anti-β2GPI en el plasma

La molécula β2GPI y la cardiolipina son moléculas ubicuas. Se han propuesto varias vías para explicar la genera-

ción de anticuerpos patógenos contra ellas. Se ha sugerido que el epítope críptico de la β2GPI está expuesto a la unión de superficies oxidadas (55). Otros han propuesto que los epítopes son reconocidos por muchos AAF que están adheridos a fosfolípidos oxidados y asociados a proteínas, como la molécula de la β2GPI (56). La forma oxidada de la β2GPI lleva un cambio conformacional y presenta nuevos epítopes, los cuales inducen anticuerpos anti-β2GPI (56,57). La presentación de las moléculas de β2GPI a las células apoptóticas mediante la unión a la fosfatidilserina puede inducir linfocitos B con receptores Ig para células apoptóticas y DNA, los cuales son seleccionados positivamente y pueden generar AAF en condiciones apropiadas (58,61). Durante los últimos años, varias bacterias y virus ubicuos han sido analizados para ver su capacidad de generar SAF experimental (11,14).

Infección y anticuerpos antifosfolipídicos

Muchas infecciones pueden acompañarse por la elevación de AAF y en algunas de ellas dicha elevación se acompaña de manifestaciones clínicas del SAF. Varias revisiones de este importante tema han sido realizadas en profundidad recientemente (62-65). Las infecciones cutáneas (18%), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (17%), las neumonías (14%), las infecciones por virus de la hepatitis C (VHC) (13%) y las infecciones urinarias (10%) constituyen las infecciones más comúnmente encontradas como factores desencadenantes en una reciente revisión (66). En 9 casos, más de un agente u órgano fueron identificados como fuentes de la infección. Otras infecciones menos frecuentes asociadas fueron las producidas por micoplasma (3 casos), tuberculosis pulmonar (2 casos), malaria (2 casos), P. carinii y leptospirosis (1 caso cada una). No solamente se producen AAC de isotipo IgM sino también se han encontrado elevaciones de IgG en algunos sueros.

SAF catastrófico e infecciones

Este subtipo de SAF, inusual y potencialmente letal, fue por primera vez descrito en 1992 (67). Desde entonces, más de 150 pacientes (68,69) han sido ampliamente analizados y documentados en publicaciones importantes, aunque actualmente más de 200 casos individuales han sido descritos (70) y su fisiopatología ha sido revisada en detalle (71). Los factores desencadenantes son cada vez más reconocidos y han sido descritos en el 51% de los casos del análisis más reciente (70). Entre estos se incluyen la cirugía (mayor o menor), la suspensión de la anticoagulación, diversos carcinomas y el más importante y común de ellos, las infecciones, las cuales han sido identificadas en el 24% de los pacientes. Diversas infecciones precediendo la aparición del SAF catastrófico (SAFC) fueron descritas en 8 pacientes por Rojas-Rodríguez y cols (72) mientras que Undas y cols (73) describieron 3 episodios de SAFC (uno de ellos con SAFC "recurrente") que fueron precedidos por una infección. La revisión más reciente de infecciones y AAF (65) mostró que 40 de los 100 pacientes (40%) se manifestaron como SAFC, el cual parece ser tan frecuente como el SAF "clásico" cuando el desencadenante es una infección. Todo esto teniendo en cuenta el escaso número de casos descritos hasta la fecha de SAFC, en comparación con los miles de casos descritos de SAF "clásico". Estas infecciones incluyen las del aparato respiratorio (10%), piel (4%), tracto urinario (4%), tubo digestivo (2%), sepsis (1%) y otras (3%). En el último grupo, se encontró un paciente que desarrolló SAFC después de una infección por fiebre tifoidea (74). Otro caso similar de oclusión de grandes vasos tras una fiebre tifoidea ha sido recientemente publicado (75), pero, aunque este paciente fue catalogado como un SAFC, no hubo evidencia de trombosis de pequeños vasos, lo cual es fundamental para el diagnóstico de SAFC, de acuerdo a las guías recientemente publicadas (76). Se han descrito ocasionalmente casos de SAFC tras diversas otras infecciones, como son dos casos de malaria (77), un caso de fiebre dengue en Brasil (78) y un caso tras la vacunación contra la encefalitis japonesa B en un paciente israelí (79). También se ha descrito la resolución del SAFC tras la amputación de una extremidad gangrenosa en dos pacientes (80). El "mimetismo molecular" se ha propuesto como uno de los principales mecanismos para el desarrollo del SAFC después de una infección (81) aunque también participan otros mecanismos.

Tabla 1. Manifestacions del SAF asociadas con infecciones víricas.

Agente infeccioso	AAC	β2GPI	Manifestaciones del SAF
Hepatitis C	IgG	+	Trombosis, infarto cerebral
VEB	IgG, IgM	+	*EP, trombosis,
Varicela	IgG, IgM	-	EP, trombosis
Parvovirus B19	IgG	+	Trombosis
CMV	IgG, IgM	+	Trombosis
HTLV-1	IgA	-	**ND
VIH	IgG, IgM, IgA	+	Ulceras en piernas, EP, ***EV, Trombosis arterial y venosa, vasculitis, livedo reticularis
Adenovirus	IgG	+	Trombocitopenia

* EP-embolismo pulmonar ** ND- no detectado *** EV – Embolismo venoso

Etiología infecciosa de los anticuerpos anti-β2GPI

Mimetismo molecular entre patógenos comunes y epítopes de la β2GPI como posible causa de la aparición de anticuerpos anti-β2GPI

La hipótesis del mimetismo molecular entre el agente patógeno y la molécula de β2GPI como causa del SAF se basa en: a) la correlación entre el desarrollo de manifestaciones del SAF y el antecendente de episodios infecciosos en humanos; b) la fuerte similitud entre péptidos de la β2GPI (epítopes diana para anticuerpos anti-β2GPI) y proteínas de diferentes patógenos comunes (Tabla 3).

Nuestro grupo ha identificado varios péptidos sintéticos como epítopes diana para los anticuerpos anti-β2GPI mediante la utilización de anticuerpos monoclonales humanos anti-β2GPI obtenidos de pacientes con SAF. Estos péptidos de la β2GPI fueron localizados en el dominio I-II (mimotope), dominio III y dominio IV (secuencias lineales) (Figura 1). Los tres péptidos sintéticos inhiben la activación de las células endoteliales *in-vitro* y la inducción de SAF experimental en ratones previamente no inmunizados y neutralizan los anticuerpos anti-β2GPI patógenos (38). La prevalencia de los anticuerpos anti péptido A-C circulantes en el suero de 295 pacientes varía entre 18% hasta 47,5% (54). Empleando la base de datos de las proteínas, nuestro grupo encontró similitudes entre nuestros péptidos y los de otras bacterias y virus comunes, levaduras y toxina tetánica (Tabla 3). Con el fin de comprobar la participación del mimetismo molecular entre el patógeno y la molécula de β2GPI como causa del SAF experimental, vacunamos a ratones previamente no expuestos con agentes microbianos patógenos, los cuales compartían homología estructural con el hexapéptido TLRVYK. Se encontraron anticuerpos IgG murinos especificos anti-TLRVYK utilizando el péptido TLRVYK purificado de un ratón inmunizado y posteriormente infundidos e.v. a ratones previamente no inmunizados en el día 0 del embarazo. Después de la inmunización, se observaron diferentes niveles de anticuerpos anti-β2GPI y los más elevados fueron encontrados en aquellos ratones inmunizados con *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* o toxoide tetánico. Los ratones infundidos con estos anticuerpos anti-ß2GPI tuvieron tasas similares de trombocitopenia, TPTA prolongado y pérdidas fetales que el grupo control de ratones inmunizados con anticuerpos anti-β2GPI monoclonales (11). Más aún, nuestro estudio estableció un mecanismo de mimetismo molecular en SAF experimental demostrando que la estructura β2GPI homóloga a la bacteriana es capaz de generar anticuerpos anti- β2GPI patógenos junto con manifestaciones de SAF (11).

TABLA 2. Prevalencia de AAC en diversas infecciones.

Infección	Prevalencia AAC (%)	Isotipo
Tifus	20	-
Lepra	33-67	IgG, IgM, IgA
Tuberculosis	27-53	IgG, IgM
Endocarditis bacteriana	5-44	IgG, IgM
Helicobacter pylori	*ND	IgG, IgM
Mycoplasma pneumonia	20-53	IgG, IgM, IgA
S. aureus	43	IgG, IgM, IgA
Streptoccocus	80	IgG, IgM, IgA
Streptoccocus pyogenus	0-80	IgG, IgM
Salmonella	60	IgG, IgM, IgA
E. Coli	67	IgG, IgM, IgA
Ornitosis	33	IgG, IgM, IgA
Coxiella butneti	42-84	IgG, IgM
Leptospirosis	50	IgG
Borrelia burgdorferi	14-41	IgG, IgM
Saccharomyces cervevisiae	ND	IgG
Malaria	30	IgG, IgM
Kala-azar	ND	IgG

De manera paralela, Gharavi y cols (82,83) indujeron anticuerpos anti-β2GPI circulantes en ratones previamente no inmunizados mediante la vacunación con péptidos sintéticos conjugados para BSA, los cuales comparten algunas similitudes con la proteína fijadora para DNA tipo 2 del adenovirus humano 72kd, con el CMV, con el HCMVA y con el *Bacillus subtilis*.

Nosotros creemos que las partículas patógenas son digeridas y presentadas a los macrófagos, a las células dendríticas o a los linfocitos B. Estas partículas patógenas son presentadas a los linfocitos T, lo cual, junto con una apropiada presentación del HLA y una activación en la expresión de la cascada de citocinas Th1/Th2, lleva a la generación de células plasmáticas que secretan anticuerpos anti-β2GPI dirigidos contra partículas patógenas, que comparten estructuras homólogas (mimetismo molecular) con la molécula β2GPI (Figura 3). El hecho de que un individuo desarrolle un SAF dependerá principalmente de su predisposición genética.

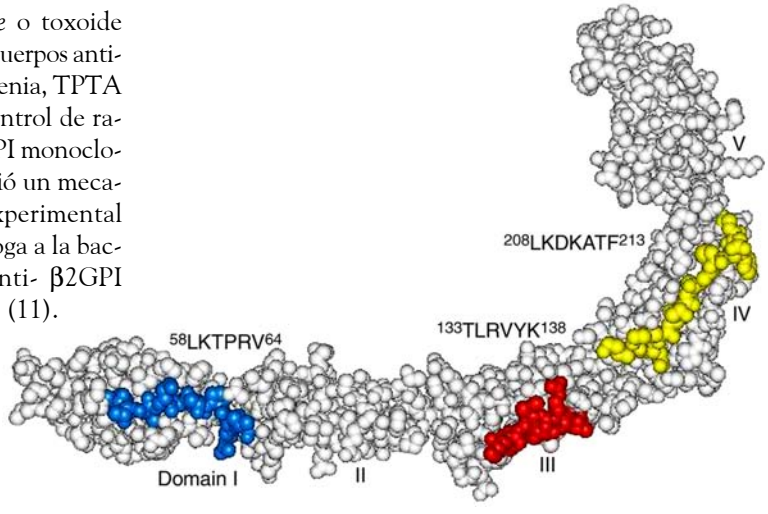


FIGURA 1.
Localización de los péptidos de la β2GPI.

Tabla 3. AAF detectados en diversas infecciones y homologías peptídicas con la β2GPI.

	Infecciones asociadas con AAF	*TLRVYK (38)	LKTPRV (38)	KDKATF (38)	GDKVSFF (49)	GRTCPKPDDLP (53)
Víricas						
CMV	+		+		+	
VEB	+	+				
VIH	+	**+	+			
Hepatitis C	+					
Parvovirus B19	+					
Adenovirus	+		+			
Varicela	+					
Vacuna	+	+				
Parotiditis	+					
Rubeola	+					
HTLV-1	+					
herpesvirus	-				+	
Bacterianas						
Lepra	+					
Tuberculosis	+	+	+			
M pneumoniae, M penetrans	+					
Salmonella	+	*+ typhi*				
Staphylococci	+	+	+	+		
Streptococci	+	*+pyogenes*	*+pyogenes*	+		
Chlamydia	-			+	+	
Trypanosome brucei rhodesiense	-	+				
Coxiella burnetii	+		+	+		
Porphyromonas gingivalis	-	+				
Helicobacter pylori	+	+	+			+3
Haemophilus influenzae	-	+		+		
Neisseria gonorrhoeae	-	+				
Neisseria meningitidis	-		+			
Shigela dysenteriae	-	+				
Pseudomonas aeroginosa	-		+			
Yersinia pseudotuberculosis	-		+			
Klebsiella pneumoniae	+			+		
Campylobacter jejuni	-	+		+		
E.Coli	-	+	+	+		
Brucella melitenensis	-			+		
Spiroquetas						
Treponema						
Palidum (Sífilis)						
Leptospira	+					
Borrelia	+	+	+			
Burgdorferi						
Parásitos						
Kala azar	+					
Schistosoma mansoni	-		+			
Toxoplasmosis	+					
Hongos						
Saccharomyces cervevisiae (Crohn)	+	+	+	+		
Candida albicans	-	+				
Streptomyces lividans	-		+			
mycoplasma	+		+ *pulmonis genitalium*	*+pneumonia capricolum genitalium pulmonis*		

* Homologías entre los péptidos de la β2GPI y diferentes agents patógenos detectadas mediante la base de datos suiza (actualizada en abril de 2003).
** Dos estructuras compartidas.

Lecciones obtenidas de la base de datos suiza sobre las correlaciones entre varios patógenos comunes, la estructura de la β2GPI y los péptidos relacionados con la β2GPI

La Tabla 3 resume las similitudes lineales entre diversos péptidos de la molécula β2GPI y patógenos comunes, reconocidas utilizando la base de datos proteica suiza. Previamente, nosotros hemos demostrado mimetismo molecular entre patógenos comunes y péptidos relacionados con la β2GPI, en los cuales se encontraron similitudes biológicas funcionales en 2 de los 7 complejos β2GPI/patógenos y los anticuerpos para estos epítopes compartidos que inducían SAF experimental. Por esto, a) debe considerarse como limitación la probabilidad de un emparejamiento incorrecto; b) debe tenerse en cuenta la probabilidad de que muchas estructuras conformacionales son compartidas entre la molécula β2GPI y patógenos comunes (posteriormente se dará un ejemplo para el virus de la vacuna, el cual comparte similitudes con estructuras terciarias con la molécula β2GPI, pero no comparte similitudes con la secuencia de aminoácidos) (Figura 2).

Helicobacter pylori, anticuerpos anti-β2GPI y SAF

El *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) es uno de los patógenos bacterianos más comunes en el humano, que coloniza la mucosa gástrica y donde parece que persiste a lo largo de toda la vida del paciente, a menos que sea tratado. La colonización induce inflamación gástrica crónica, lo cual puede progresar a una variedad de enfermedades que van desde una gastritis superficial y una úlcera péptica a un cáncer gástrico o a un linfoma de mucosa. Se ha propuesto que las características específicas de cada cepa son las responsables de la capacidad de cada organismo para causar diferentes enfermedades, o incluso para influir de manera positiva en la capacidad para la cepa de infectar el huésped de manera crónica a lo largo de la vida (84). Recientemente se describió la desaparición de los AAF tras la erradicación del *H. pylori* (85).

La diferente información acumulada demuestra que el *H. pylori* tiene diversos efectos clínicos: a) La infección por el *H. pylori* puede afectar el crecimiento fetal intrauterino, aumentando el riesgo de desarrollar trastornos reproductivos (87); b) los ratones infectados por *H. pylori* tienen un nivel elevado de embolización de plaquetas tras un daño en las arteriolas (88); c) la infección por el *H. pylori* se ha sugerido como un factor de riesgo para la isquemia cerebral (89) y como factor de riesgo para enfermedad coronaria (90). En todos estos casos, la correlación entre anticuerpos anti-β2GPI o péptidos relacionados con la β2GPI deberían ser analizados. El cribado en 50 pacientes con infección por *H. pylori* para la presencia de anticuerpos anti-β2GPI mostró una prevalencia del 33,3% (91).

Basados en el gran número de genes relacionados con la secuencia que codifica proteínas de membrana y la presencia de trayectos homopoliméricos y de repetición de dinucleótidos en las secuencias codificadas, el *H. Pylori*, como otros patógenos de la mucosa, presentan mecanismos para la variación antigénica y la evolución adaptativa. Asimismo, el *H. pylori* tiene pocas redes de regulación y un limitado repertorio metabólico. Su supervivencia, en

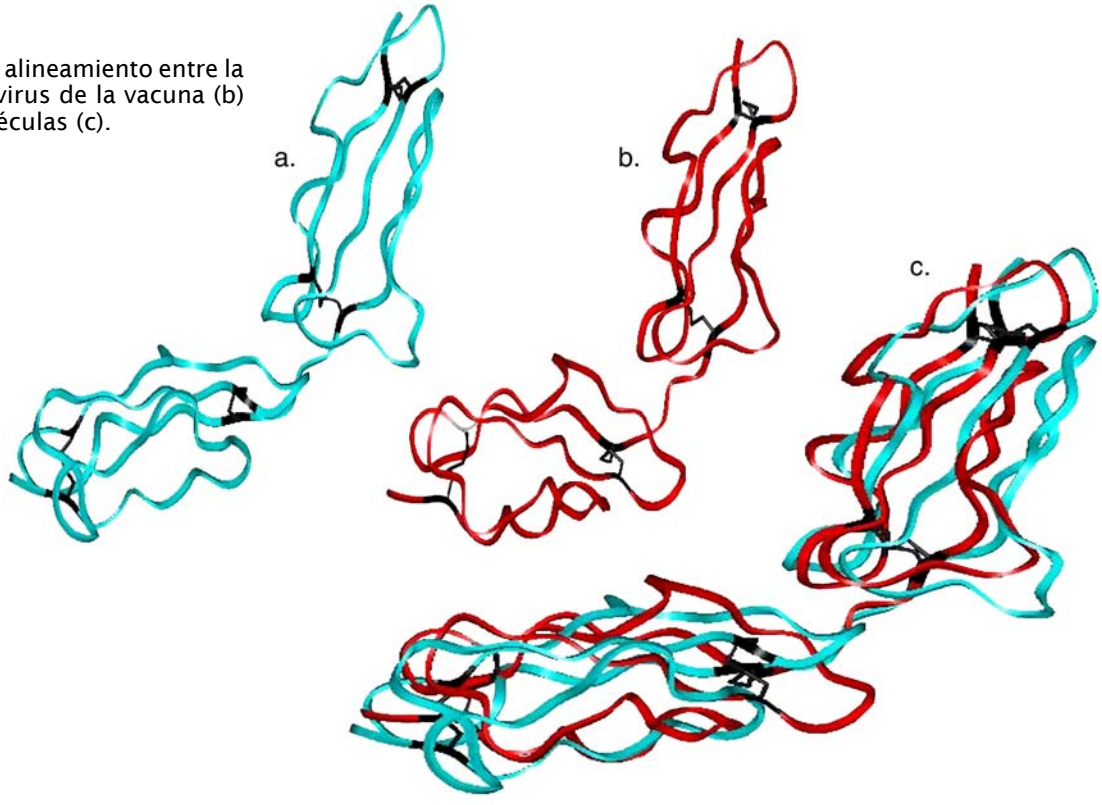


FIGURA 2.
Diagrama del alineamiento entre la β2GPI (a), el virus de la vacuna (b) y ambas moléculas (c).

condiciones ácidas, depende en parte de su capacidad de establecer un potencial interno de membrana a un pH bajo (92). Utilizando la base de datos proteica suiza, nuestro grupo fue capaz de detectar similitudes (mis 1-2) entre los epítopes diana de los péptidos de β2GPI y estructuras de *H. pylori* (Tabla 3), como, por ejemplo, la proteína Q9zmk9, una proteína de reparación del DNA homóloga al radA, que juega un papel en la reparación endógena al daño por alquilación, la proteína de división celular ftsA-Q9zmk3, que está involucrada en el crecimiento filamentoso anómalo (por similitud), el antígeno inmunodominante asociado con la citotoxicidad –P55980, que es necesario para la transcripción, el plegamiento, la exportación y la función de citotoxinas, la proteína 2 asociada al gancho flagelar (HAP2) –P96786, un factor esencial en la estructura y movilidad flagelar, la Q9zmz4 y la subunidad alfa ureasa P14916 (urea amino hidrolasa).

Streptococcus pyogenes, anti-β2GPI y SAF

La fiebre reumática (FR) y la posterior enfermedad cardiaca reumática son enfermedades del tejido conjuntivo relativamente comunes causadas por el *Streptoccocus pyogenes*. Se ha descrito el mimetismo molecular, principalmente entre la proteína M y las propias estructuras, como el principal mecanismo para el desarrollo de FR aguda después de una faringitis estreptocócica. La proteína M y otros antígenos aún no muy bien definidos de la célula bacteriana han sido relacionados con una reacción cruzada con proteínas humanas que tienen estructuras enrolladas, como la miosina, la tropomiosina y las proteínas valvulares. Además de la aparente reacción cruzada entre los anticuerpos anti-steptoccocus, la inmunología de la FR es complicada por los anticuerpos cardiacos bajo la forma de inmunoglobulinas que se unen al miocardio y endocardio, como también por otros anticuerpos circulantes en el suero que se une contra estructuras cardiacas. En la FR se ha decrito una amplia variedad de respuestas por anticuerpos. Dicha respuesta puede estar relacionada con la hiperactivación de los linfocitos B o con las reacciones cruzadas dependientes de antígenos (93-95).

La FR y el SAF comparten ciertas similitudes clínicas como son el compromiso del sistema nervioso central y del corazón. Nosotros creemos que puede ser consecuencia de una reacción cruzada entre la proteína M y la β2GPI. Los péptidos TLRVYK y LKTPRV relacionados con la β2GPI comparten similitudes con la proteína M *del Streptococcus pyogenes*. El péptido TLRVYK relacionado con la β2GPI inhibe la unión de los anticuerpos anti proteína M de los pacientes con FR en un 37%. Los anticuerpos anti-β2GPI pueden ser inhibidos por la proteina M que se une a la β2GPI en un 23%.

Borrelia burgdorferi, anti-β2GPI y SAF

La espiroqueta *Borrelia burgdorferi* es la causante de la enfermedad de Lyme. Un subgrupo de pacientes (50%) con neuroborreliosis muestran reactividad IgG para cardiolipina en fase sólida ELISA (96,97). Ya que la prueba fue realizada en 1987 con el suero como bloqueador, probablemente la reacción es dependiente de β2GPI.

Los péptidos TLRVYK y LKTPRV relacionados con la β2GPI comparten similitudes con la *Borrelia burgdorferi*, la glicerol cinasa-Q51257 y la proteína glutamato-metil-esterasa-051376.

Saccharomyces cerevisiae, anti-β2GPI y SAF

Los anticuerpos circulantes anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgA e IgG (ASCA) son unos de los marcadores principales de la enfermedad de Crohn (98). Dentro de las respuestas serológicas que se encuentran en esta enfermedad están los anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae*, anti-micobacterias, anti-bacteroides, anti-listeria y anti-*E. coli*. Muchos de estos microorganismos participan en la patogenia de la enfermedad de Crohn. La oligomanosa, la paratuberculosis p35 y los antígenos p36 son epítopes del Saccharomyces cerevisiae demostrados hasta en un 60 a un 70% de los pacientes con enferemedad de Crohn. Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tienen niveles circulantes elevados de AAC y anti-β2GPI (99-101) y, aunque se han descrito casos de trombosis asociados a la elevación de anti-β2GPI en la enfermedad de Crohn (99-101), su papel patogénico aún no está claramente establecido.

La asociación con los ASCA ha sido descrita también en otra enfermedad autoinmune, como la enfermedad de Behçet, aunque sin ninguna relevancia clínica (102). La trombosis, habitualmente venosa, ocurre entre un 10 a un 25% de los pacientes con enfermedad de Behçet, aunque su patogenia aún se desconoce (101). Se han descrito asociaciones entre el SAF y la enfermedad de Behçet, incluyendo un caso de trombosis total de la vena cava (105). Famularo y cols. (106) describieron un caso de un paciente con una recaída potencialmente letal de una enfermedad de Behçet asociada a un SAFC. El paciente experimentó en un período corto de tiempo un infarto agudo de miocardio recurrente, múltiples trombosis venosas, uveítis y eritema nudoso. La investigación de factores trombofílicos mostró positividad para AL, cumpliendo así criterios para SAF (106). La reactividad cruzada funcional entre los ASCA, los anti-β2GPI y los péptidos relacionados con anti-β2GPI debe ser analizada en un futuro.

Finalmente, utilizando la base de datos de proteínas suiza, se han encontrado varias similitudes entre los péptidos relacionados con la β2GPI y el *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 3).

Actividad dual de los anticuerpos anti-β2GPI frente a las infecciones

Un amplio rango de interacciones proteína-proteína específicas en la superficie celular y en el suero son mediadas por unos dominios proteicos versátiles funcionalmente con 60 residuos de aminoácidos, llamados proteínas de control del complemento (PCC), los cuales se caracterizan por poseer una única secuencia consensuada. Entre los ligandos, podemos encontrar la molécula de β2GPI, la

heparina, el virus del Epstein Barr (VEB), el virus del sarampión, el enterovirus 70, el ecovirus y proteínas bacterianas como la proteína M del grupo del *Staphilococcus pyogenes* y la molécula de adhesión de *E. coli*. Los módulos PCC han sido identificados hasta ahora en 50 proteínas plasmáticas diferentes de mamíferos, en la superficie de muchos tipos celulares, en la matriz acrosomal del espermatozoide, la retina, el cerebro y otras (107).

Utilizando la base de datos proteica suiza, encontramos un alineamiento fuertemente significativo entre la molécula de β2GPI y varias secuencias relevantes o moléculas de control de patógenos. Aquí presentamos algunos ejemplos y discutimos la relevancia funcional de los anticuerpos anti-β2GPI como autoanticuerpos naturales o como anticuerpos patógenos.

Virus de la vacuna

El virus de la vacuna y la gammaglobulina anti-vacuna son utilizados para la vacunación contra la viruela. Aunque esta enfermedad actualmente está erradicada en la mayoría de países, algunas muertes atribuidas a la vacunación contra la viruela fueron debidas a la transmisión del virus de la vacuna (108). Los dominios 3-4 de la molécula b2GPI comparten estructuras terciarias similares a la PCC del virus de la vacuna (VCP) (Q89859) (Figura 3). Esta proteína de 253 residuos es un regulador de la activación del complemento y su papel es defender al virus contra el ataque del sistema de complemento del huésped. La β2GPI compite junto a esta proteína de residuo VCP por su receptor de reconocimiento, facilitando la activación del complemento como respuesta al virus. Los anticuerpos anti-β2GPI pueden actuar sobre los VCP mediante la neutralización del virus inhabilitando la activación del complemento.

Interrelación entre el VEB, la β2GPI y los anticuerpos anti-β2GPI

El CR2 es el receptor para el C3d, el fragmento de 33kd del tercer componente del complemento. El CR2 es también el receptor del VEB (EBV/C3d, CD 21). EL CR2 se une a sus dos ligandos extracelulares, el C3d y la glicoproteína de la cápside del VEB gp350/220 a través de 2 sitios diferentes de unión. El CR2 permite al C3d y al VEB inducir proliferación (109). Teóricamente, se pueden prever diferentes escenarios con respecto a las interrelaciones VEB-β2GPI y los anticuerpos anti-β2GPI: Los anticuerpos anti-β2GPI pueden generarse por un mecanismo de mimetismo molecular como está descrito en la Figura 2. Estos anticuerpos pueden neutralizar el VEB o el CR2 si reconocen un epítope compartido y así prevenir la mononucleosis infecciosa. Asimismo, pueden aumentar la gravedad de la enfermedad si los anticuerpos anti-β2GPI reconocen diferentes epítopes en el VEB y en el CR2. La presencia de los anticuerpos anti-β2GPI circulante ha sido descrita en pacientes con mononucleosis infecciosa sin correlación con la actividad de la enferme-

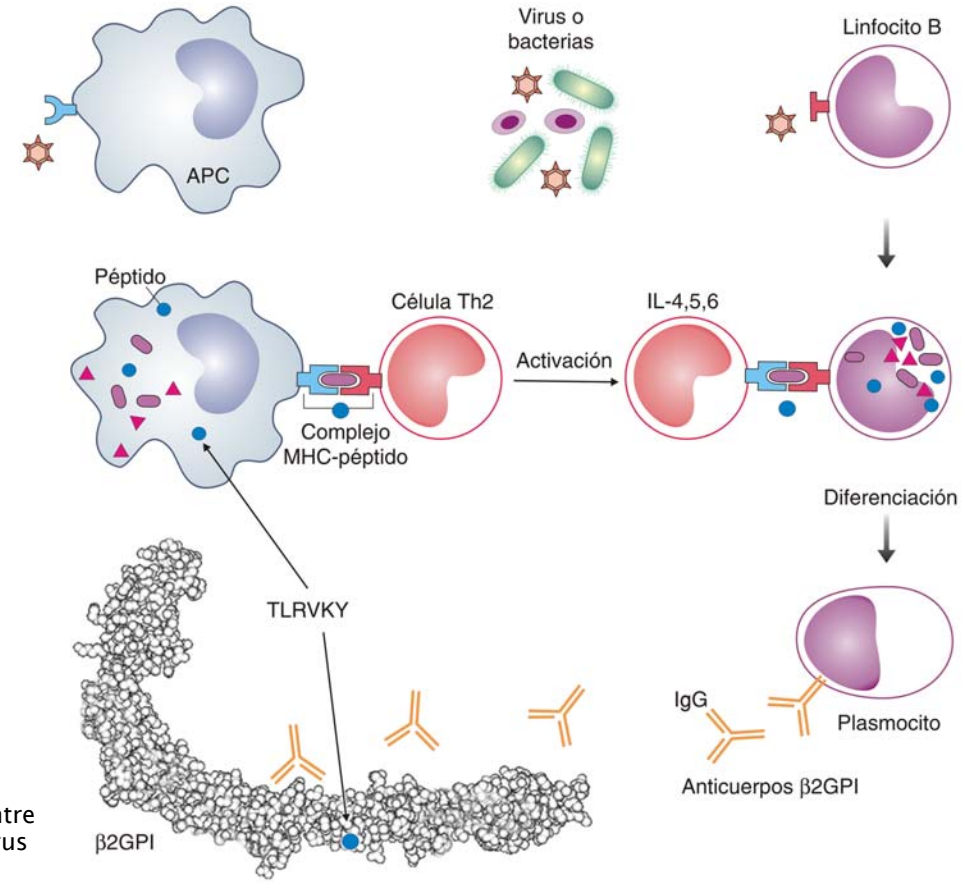


FIGURA 3.
Mimetismo molecular entre la β2GPI y bacterias y virus comunes.

dad (110). Sin embargo, un amplio rango de poblaciones han sido expuestas al VEB sin tener anticuerpos anti-β2GPI ni mononucleosis infecciosa.

Compromiso de los anticuerpos anti-β2GPI en el control de la activación del complemento

Como se discutió previamente, la exposición a un patógeno puede inducir la generación de anticuerpos anti-b2GPI patogénicos contra los epítopes compartidos entre el patógeno relevante y la molécula β2GPI. Teniendo un alto alineamiento entre la β2GPI y algunas PCC, los anticuerpos anti-β2GPI pueden interferir con la activación del complemento. Uno de los mecanismos propuestos para el SAFC es el aumento de la activación del complemento (114,115). Además, muchos estudios han mostrado que la activación no controlada del complemento en la placenta lleva a la muerte fetal *in utero*. La inhibición *in-vivo* de la cascada del complemento previene las pérdidas fetales inducidas por anticuerpos anti-β2GPI, utilizando el inhibidor C3 de la convertasa CR-1 relacionada con el gen/proteína (Crry)-Ig (116). Teóricamente, la β2GPI puede tener mimetismo con el CR1; así, los anticuerpos anti-β2GPI pueden proteger al inhibidor del complemento y aumentar la activación de éste.

Anticuerpos anti-β2GPI y el cofactor de la proteína de membrana CD46

Un fuerte alineamiento entre la β2GPI y una estructura terciaria del cofactor de la proteína de membrana (CPM) CD 46 (5e-18) fue detectado en la base de datos. El CPM fue previamente identificado como la célula receptora del huésped para las cepas del virus del sarampión del laboratorio Edmonston. La CD46 es una molécula ubicua, miembro de la familia de las proteínas protectoras reguladoras de la activación del complemento e interfiere con la formación del complejo de ataque del complemento en la membrana de las células normales y previene la lisis de las células no reguladas del huésped (117). Por esto, la CD46 juega un papel importante en la protección del tejido no infectado contra el daño mediado por el complemento. Es un tipo de glucoproteína de membraba con diferentes isoformas de 57-67 masas moleculares. Así, los anticuerpos anti-β2GPI neutralizarán esta proteína y permitirán el aumento en la activación del complemento y la patogenia de la enfermedad. Asimismo, la CD46 se une por medio de una interacción hidrofóbica con la proteína H del sarampión. Mediante un posible mimetismo molecular con la molécula CD46, la β2GPI podría fijar la proteína H del sarampión y proteger la célula normal.

Relación con la inmunidad innata

Los receptores "*toll-like*" (TLR) son responsables de la respuesta protectora inmediata contra patógenos (inmunidad innata) e instruyen la respuesta inmune adquirida (118). Recientemente, se ha postulado la existencia de un punto de unión entre los sistemas de inmunidad innata y adquirida en el desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas como el lupus eritematoso sistémico (119-121). Los linfocitos B desarrollan un papel esencial en la respuesta inmune adquirida y en la innata. Se han encontrado complejos de cromatina-IgG para activar los linfocitos B mediante un convenio dual de IgM con los TLR (122), lo cual es conocido para detectar el DNA CpG bacteriano (123). Estudios recientes han revelado estructuras moleculares comunes de los microorganismos, como los lipopolisacáridos (LPS), que son reconocidas por los TLR. Los linfocitos B tienen dos TLR que median la señalización por LPS: TLR4 y PR105 (CD180). La importancia de los TLR en el estado de procoagulación de las células endoteliales en el SAF fue propuesto recientemente por Meroni y cols (124), los cuales demostraron el papel de la vía de señales de traducción del MyD88 en la activación de las células endoteliales por los anticuerpos anti-β2GPI. Los anticuerpos reaccionaron con la ß2GPI en asociación con la familia del receptor de TLR/IL-1 en la superficie de las células endoteliales (124).

Consideraciones terapéuticas

Como ha sido resumido anteriormente, existe suficiente evidencia científica que indica una etiología infecciosa del SAF. Esto genera la importante pregunta de si se debe iniciar una terapia antibiótica, como tratamiento preventivo o terapéutico, especialmente en el SAFC. Se requiere más información para resolver este enigma. Ello dependerá de si el mecanismo de la enfermedad es puntual (125,126) o es una estimulación continua al sistema inmunológico. El estudio que mostró que el SAF fue controlado mediante la erradicación del *H. pylori* con terapia antibiótica (85) remarca el impacto de la presencia continua de una bacteria en la inducción de la enfermedad. En otro estudio que empleó un modelo experimental de SAF, el tratamiento con ciprofloxacino mejoró el cuadro clínico por inducción de IL-3 y expresión de GM-CSF (127). Estos trabajos apoyarían el uso del tratamiento antibiótico en la terapia de los pacientes con SAF. La utilización de inmunoglobulinas endovenosas (Ig ev) para los casos graves de SAF, como el SAFC, debería ser recomendada, teniendo en cuenta el mecanismo anti-idiotipo de la Ig ev (128-130), como también los amplios efectos antibacterianos y antivirales (131,132).

Referencias

1. Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. FASEB J 1998; 12: 1255-1265
2. Karlsen AE, Dyrberg T. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. Semin Immunol 1998;10:25-34
3. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. N Engl J Med. 1999;341: 2068-2074
4. Regner M, Lambert PH. Autoimmunity through infection or immunization? Nature Immunol 2001;2:185-188
5. Wucherpfennig KW. Structural basis of molecular mimicry. J Autoimmunity 2001;16:293-302
6. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. Science 1985:230:1043-1045
7. Singh VK, Kalra HK, Yamaki K, et al. Molecular mimicry between a uveitopathogenic site of S-antigen and viral peptides. Induction of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. J Immunol 1990;144: 1282-1287
8. Zhao ZS, Granucci F, YehL, et al. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. Science 1998; 279: 1344-1347
9. Gautam AM, Liblau, R, Chelvanayagam G, et al. A viral peptide with limited homology to a self peptide can induce clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 1998;161: 60-64
10. Levin MC, Lee SM, Kalume F, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. Nat Med 2002; 8:509-513
11. Blank M, Krause I, Fridkin M, et al. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. J Clin Invest 2002; 109:797-804
12. Shoenfeld Y. Etiology and pathogenetic mechanisms of the antiphospholipid syndrome unraveled. Trends Immunol 2003; 24:2-4
13. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, et al. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. J Immunol 1999; 163:2922-2927
14. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, et al. Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. Arthritis Rheum 2002; 46:545-552
15. Harris EN, Gaharavi AE, Boey ML, et al: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 1983;2:1211-1214
16. Hughes GRV, Harris EN, AE Gharavi. The anti-cardiolipin syndrome. J Rheumatol 1986; 13:486-489
17. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, et al. Milestones in the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, (eds). The antiphospholipid syndrome II - Autoimmune thrombosis. Elsevier, Amsterdam, 2002
18. Galli M, Comfurious P, Massen C, et al. Anti-cardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 1990; 335:1544-1547
19. Cervera R, Piette JC, Font J, et al: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Arthritis Rheum 2002; 46: 1019-1027
20. Asherson RA and Cervera R. The antiphospholipid syndrome: multiple faces beyondthe classical presentation. Autoimm Rev 2003;2:140-151
21. Shoenfeld Y. Systemic antiphospholipid syndrome. Lupus 2003;497-498
22. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. EMBO J 1999;18:6228-6239
23. Bouma B, de Groot PG, Jean M.H. van den Elsen JML , Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink MJA, Derksen RWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human beta$_2$-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure EMBO J 1999;18: 5166-5174
24. Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, et al. Beta 2 lycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. Br J Haematol 1996;93: 185-194
25. Koike T, Ichikawa K, Atsumi T, et al. Beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I interaction. J Autoimmun 2000;15:97-100
26. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, et al. Apoptotic cell clearance in systematic lupus erythematosus II. Role of ?-glycoprotein I. Arthritis Rheum. 1998;41: 215-223
27. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, et al. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with ß$_2$-glycoprotein I (apolipoprotein H). J Clin Invest. 1992;90:1105-1111
28. Pierangeli SS, Harris EN. Induction of phospholipid-binding antibodies in mice and rabbits by immunization with human ß$_2$-glycoprotein I or anticardiolipin antibodies alone. Clin Exp Immunol. 1993;93: 269-273
29. Blank M, Faden D, Tincani A, et al. Immunization with anticardiolipin cofactor (ß$_2$-glycoprotein-I) induces experimental APS in naive mice. J Autoimmun 1994;7:441-447
30. Garcia C, Kanbour-Shakir A, Tang H, et al. Induction of experimental antiphospholipid syndrome in PL/J mice following immunization with ß$_2$-glycoprotein I. J Invest Med 1996; 44:69A
31. Aron A L, Cuellar RL, Brey RL, et al. Early onset of autoimmunity in MRL/++ mice following immunization with ß$_2$-glycoprotein I. Clin Exp Immunol. 1995;101:78-82
32. Blank M, George J, Barak V, et al. Oral Tolerance to Low Dose ß$_2$-Glycoprotein I: Immunomodulation of experimental antiphospholipid syndrome. J Immunol 1998;161: 5303-5312
33. Shi W, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. Blood 1993;81:1255-1262
34. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, et al. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. J Immunol 1994; 153:1328-1332
35. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, et al. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost 1998;79:276-281
36. Sthoeger ZM, Mozes E, Tartakovsky B. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:6464-6467
37. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, et al. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in-vivo and in-vitro. J Immunol 1999;163:2922-2927
38. Blank M, Shoenfeld Y, Cabilli S, et al. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. Proc Natl Acd Sci 1999;96:5164-5168
39. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. Arthritis Rheum 2001;44:2870-2878
40. Pierangeli SS, Liu X, Espinola R, et al. Functional analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. Thromb Haemost 2000; 84:388-395
41. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with anti-phospholipid antibodies cause fetal death in BALBA/c mice: a model for autoimmune fetal loss. Am J Obstet Gynecol 1990;163:210-216
42. Blank M, Cohen J, Toder V, et al. Induction of primary anti-phospholipid syndrome in mice by passive transfer of anti-cardiolipin antibodies. Proc Natl Acad Sci (USA) 1991; 88:3069-3073
43. Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J Exp Med 2002; 195:211-220
44. Blank M, Waisman A, Mozes E, et al. Characteristics and pathogenic role of anti-beta2-glycoprotein I single-chain Fv domains: induction of experimental antiphospholipid syndrome. Int Immunol 1999;11: 1917-1926
45. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol 1994;152:653-659
46. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM: Anti-beta2 glycoprotein I (beta 2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:15542-15546
47. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, et al. Human beta2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. Blood 1996;87:3262-3270
48. Wang MX, Kandiah DA, Ichikawa K, et al. Epitope specificity of monoclonal anti-beta 2-glycoprotein I antibodies derived from patients with the antiphospholipid syndrome. J Immunol 1995; 155:1629-1636
49. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden Stanfield M, et al. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. J Immunol 1999; 163:2922-2927
50. Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, et al. Autoreactive CD4(+) T-cell clones to beta2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: preferential recognition of the major phospholipid-binding site. Blood 2001; 98:1889-1896
51. Hong DP, Hagihara Y, Kato H, et al. Flexible loop of beta 2-glycoprotein I domain V specifically interacts with hydrophobic ligands. Biochemistry 2001;40:8092-8100
52. Ito H, Matsushita S, Tokano Y, et al. Analysis of T cell responses to the beta 2-glycoprotein I-derived peptide library in patients with anti-beta 2-glycoprotein I antibody-associated autoimmunity. Hum Immunol 2000;61:366-377
53. Visvanathan S, Scott JK, Hwang KK, et al. Identification and characterization of a peptide mimetic that may detect a species of disease

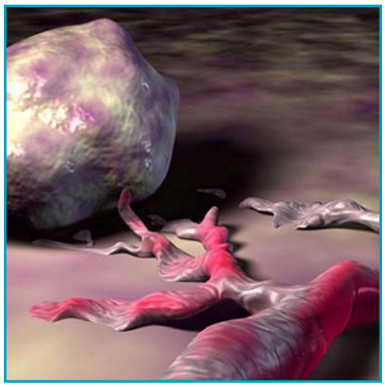
-associated anticardiolipin antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 2003;48:737-745
54. Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, et al. Prevalence and clinical correlations of antibodies against six b2-glycoprotein-i-related peptides in the antiphospholipid syndrome. J Clin Immunol. 2003; 23: 377-383
55. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, et al. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J Exp Med 1994;179:457-462
56. Horkko S, Miller E, Branch DW, et al. The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and beta2 glycoprotein 1 (and other proteins). Proc Natl Acad Sci (USA). 1997;94:10356-10361
57. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. N Engl J Med 2002; 346:752-763
58. Rauch J, Subang R, D'Agnillo P, et al. Apoptosis and the antiphospholipid syndrome. J Autoimmun. 2000; 15:231-235
59. D'Agnillo P, Levine JS, Subang R, et al. Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable, cells and serves as a target of lupus anticoagulant autoantibodies. J Immunol 2003;170:3408-3422
60. Sorice M, Circella A, Misasi R, et al. Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipids antibodies. Clin Exp Immunol 2000; 122:277-2784
61. Cocca BA, Seal SN, D'Agnillo P, et al. Structural basis for autoantibody recognition of phosphatidylserine-beta 2 glycoprotein I and apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:13826-31
62. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C. The Antiphospholipid Syndrome and Infection. Current Rheumatology Reports 2001; 3: 277-285
63. Zandman -Goddard G, Blank M, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibodies and Infections – Drugs. In: The Antiphospholipid Syndrome II. Autoimmune Thrombosis. Asherson RA Cervera R, Shoenfeld Y, Piette J- C. (Eds) (Elsevier) 2002; pp 343-358
64. Uhtman IW, Gharavi AE. Viral Infections and Antiphospholipid Antibodies. Semin Arthritis Rheum 2002;31: 256 – 263
65. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid Antibodies and Infections. Ann Rheum Dis 2003;62:388-393
66. Cervera R, Asherson RA, Acevedo ML, et al. Antiphospholipid syndrome associated with infections: Clinical and microbiological characteristics of 100 patients. Ann Rheum Dis 2004; 63: 1312-1317
67. Asherson RA. The Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. J Rheumatol 1992;19:508 –512
68. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients. Medicine (Baltimore) 1998;77:195-207
69. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Clues to the pathogenesis from a series of 80 patients. Medicine (Baltimore) 2001; 80:355-377
70. Cervera R, Gómez-Puerta JA, Espinosa G, et al. A review of 200 cases from the International Registry of patients with the Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS). Ann Rheum Dis 2003; 62 (suppl.1): 88
71. Asherson RA. The pathogenesis of the catastrophic antiphospholipid syndrome. J Clin Rheumatol 1999; 4:249 –252
72. Rojas – Rodriguez J, Garcia – Carrasco M, Ramos – Casals M, et al.Catastrophic antiphospholipid syndrome: Clinical description and triggering factors in 8 patients. J Rheumatol. 2000;238-240
73. Undas A, Swadzba J, Undas R, et al. Three episodes of acute multiorgan failure in a woman with secondary antiphospholipid syndrome. Pol Arch Med Wewn 1998;56-60
74. Hayem G, Kassis N, Nicaise P, et al. Systemic lupus erythematosus associated with catastrophic antiphospholipid syndrome occurring after typhoid fever. A possible role of Salmonella lipopolysaccharide in the occurrence of diffuse vasculopathy – coagulopathy. Arthritis Rheum 1999;1056-1061
75. Uhtman I, Taher A, Khalil I, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome associated with typhoid fever: Comment on the article by Hayem et al. Arthritis Rheum. 2002;46:850
76. Asherson R, Cervera R, de Groot PG Erkan D, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement criteria and treatment guidelines. Lupus, 2003; 12:530-534
77. Ehrenfeld M, Bar-Natan M, Sidi Y, et al. Antiphospholipid antibodies associated with severe malaria infection. Lupus.2002;611
78. Levy R. Personal communication.2004
79. Chapman J. Personal communication.2004
80. Amital H, Levy Y, Davidson C, et al.Catastrophic antiphospholipid syndrome: Remission following leg amputation in 2 cases. Semin Arthritis Rheum. 2001;31:127-32
81. Asherson RA, Shoenfeld Y. The role of Infection in the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome –molecular mimicry J Rheumatol 2000;27:12 – 14
82. Gharavi EE, Chaimovich H, Cucurull E, et al. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with synthetic viral and bacterial peptides. Lupus 1999; 8:449-455
83. Gharavi AE, Pierangeli SS, Harris EN. Viral origin of antiphospholipid antibodies: endothelial cell activation and thrombus enhancement by CMV peptide-induced APL antibodies. Immunobiology 2003;207: 37-42
84. Alm RA, Ling LSL, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori . Nature 1999;397:176-180
85. Cicconi V, Carloni E, Franceschi F, et al. Disappearance of antiphospholipid antibodies syndrome after Helicobacter pylori eradication. Am J Med 2001;111:163-164
86. Eslick GD, Yan P, Xia HH, et al. Foetal intrauterine growth restrictions with Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther 2002;16: 1677-1682
87. Figura N, Piomboni P, Ponzetto A, et al. Helicobacter pylori infection and infertility. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2002;14:663-669
88. Aguejouf O, Mayo K, Monteiro L, et al. Increase of arterial thrombosis parameters in chronic Helicobacter pylori infection in mice. Thromb Res 2002; 108:245-248
89. Grau AJ, Buggle F, Lichy C, et al. Helicobacter pylori infection as an independent risk factor for cerebral ischemia of atherothrombotic origin. J Neurol Sci. 2001;186:1-5
90. Pellicano R, Broutet N, Ponzetto A, et al. Helicobacter pylori: from the stomach to the heart. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999;11:1335-1337
91. Sorice M, Pittoni V, Griggi T, et al. Specificity of anti-phospholipid antibodies in infectious mononucleosis: a role for anti-cofactor protein antibodies. Clin Exp Immunol. 2000;120:301-306
92. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 1997;388: 539-547
93. Krisher K, Cunningham M W. Myosin : A link between streptococci and heart: Science. 1985;227:413-415
94. M.S.Bronze, J.B. Dale. Epitopes of Streptococcal M proteins that evoke antibodies that cross-react with human brain. J Immunol 1993;151,1: 2820-2828
95. Benoist C, Mathis D: Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? Nat Immunol 2001;2:797-801
96. Benhamou C, Gauvain JB, Meyer O, et al. Anti-cardiolipin antibodies in Lyme disease. Rev Rhum Mal Osteoartic 1987;54:397-399
97. Garcia Monco JC, Wheeler CM, Benach JL, et al. Reactivity of neuroborreliosis patients (Lyme disease) to cardiolipin and gangliosides. J Neurol Sci 1993;117:206-214
98. Shafran I, Piromalli C, Decker JW, et al. Seroreactivities against Saccharomyces cerevisiae and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis p35 and p36 antigens in Crohn's disease patients. Dig Dis Sci 2002; 47:2079-2081
99. Aichbichler BW, Petritsch W, Reicht GA, et al. Anti-cardiolipin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1999;44:852-856
100. Thong BY, Chng HH, Ang CL, et al. Recurrent venous thromboses, anti-cardiolipin antibodies and Crohn's disease. QJM 2002;95:253-255
101. Koutroubakis IE, Petinaki E, Anagnostopoulou E, et al. Anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1998; 43:2507-2512
102. Krause I, Monselise Y, Milo G, et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies—a novel serologic marker for Behcet's disease. Clin Exp Rheumatol 2002;20(Suppl 26):S21-24
103. Houman H, Lamloum M, Ben Ghorbel I, et al. Vena cava thrombosis in Behcet's disease. Analysis of a series of 10 cases. Ann Med Interne (Paris). 1999;150:587-590
104. El-Ageb EM, Al-Maini MH, Al-Shukaily AK, et al. Clinical features of Behcet's disease in patients in the Sultanate of Oman; the significance of antiphospholipid antibodies? Rheumatol Int 2002;21:176-181
105. Mukai Y, Tsutsui H, Todaka K, et al. Total occlusion of inferior vena cava in a patient with antiphospholipid antibody syndrome associated with behcet's disease. Jpn Circ J 2001; 65:837-838
106. Famularo G, Antonelli S, Barracchini A, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome in a patient with Behcet's disease. Scand J Rheumatol 2002; 31:100-102
107. Wiles AP, Shaw G, Bright J, et al. NMR Studies of a viral protein that mimics the regulators of complement activation: J Mol Biol 1997;272: 253-265
108. Breman JG, Isao Arita I, Fenne F: Preventing the Return of Smallpox. N Eng J Med 2003; 348:463-466
109. Bouillie S, Barel M, Frade R. Signaling through the EBV/C3d receptor (CR2, CD21) in human B lymphocytes: activation of phosphatidylinositol 3-kinase *via* a CD19-independent pathway. J Immunol 1999; 162:136-143
110. Sorice M, Pittoni V, Griggi T, et al. Specificity of anti-phospholipid

antibodies in infectious mononucleosis: a role for anti-cofactor protein antibodies. Clin Exp Immunol 2000;120:301-306
111. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of beta2-glycoprotein I. Arthritis Rheum 1998;41:215-223
112. Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, et al. Dendritic cell presentation of antigens from apoptotic cells in a proinflammatory context: role of opsonizing anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Arthritis Rheum 1999; 42:1412-1420
113. Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, et al. A specific ligand for beta(2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. J Lipid Res 20001;42:697-709
114. Salmon JE, Girardi G, Holers VM. Complement activation as a mediator of antiphospholipid antibody induced pregnancy loss and thrombosis. Ann Rheum Dis 2002;61 Suppl 2:ii46-50
115. Caucheteux SM, Kanellopoulos-Langevin C, Ojcius DM. At the innate frontiers between mother and fetus: linking abortion with complement activation. Immunity 2003;18:169-172
116. Holers VM, Girardi G, Mo L, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J Exp Med 2002; 195:211-220
117. Hsu EC, Sabatinos S, Hoedemaeker FJ, et al. Use of site-specific mutagenesis and monoclonal antibodies to map regions of CD46 that interact with measles virus H protein. Virology 1999; 258:314-326
118. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. N Eng J Med 2000;343: 338-344
119. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, Nat ImmunoL 2001;2:675-680
120. Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. Nat Immunol 2002;3:423-424
121. Leadbetter EA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors and activation of autoreactive B cells. Curr Dir Autoimmun 2003;6:105-122
122. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature 2002;416:603-607
123. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000;408:740-745
124. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, et al. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies, Blood 2003; 101:3495-3500
125. Gallagher A, Perry J, Freeland J, et al. Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus (EBV): no evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated. Int J Cancer 2003;104:624-630
126. Scarisbrick A, Rodríguez M. Hit-hit and hit-run: viruses in the playing field of multiple sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 2003;3:265-271
127. Blank M, George J, Fishman P, et al. Ciprofloxacin immunomodulation of experimental antiphospholipid syndrome associated with elevation of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. Arthritis Rheum 1998;41:224-232
128. Dietrich G, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Modulation of autoimmunity by intravenous immune globulin through interaction with the function of the immune/idiotypic network. Clin Immunol Immunopathol 1992;62: S73-81
129. Bakimer R, Blank M, Kosashvilli D, et al. Antiphospholipid syndrome and the idiotypic network. Lupus 1995;4:204-208
130. Bakimer R, Guilburd B, Zurgil N, et al. The effect of intravenous gamma-globulin on the induction of experimental antiphospholipid syndrome. Clin Immunol Immunopathol 1993; 69:97-102
131. Krause I, Wu R, Sherer Y, et al. *In vitro* antiviral and antibacterial activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations -a potential role for adjuvant intravenous immunoglobulin therapy in infectious diseases. Transfus Med 2002;12:133-139
132. Shoenfeld Y. Common infections, idiotypic dysregulation, autoantibody spread and induction of autoimmune diseases. J Autoimmun 1996;9: 235-239

21

CÁNCER Y AUTOINMUNIDAD: ASPECTOS AUTOINMUNES Y REUMATOLÓGICOS EN PACIENTES CON CÁNCER

Yehuda Shoenfeld
Gabriel Jaime Tobón
Patricia Vega
Juan-Manuel Anaya



Contenido

Autoanticuerpos en pacientes con cáncer
Síndromes autoinmunes paraneoplásicos
Reumatismo postquimioterapia
Conclusión

Los pacientes con enfermedades malignas pueden desarrollar fenómenos autoinmunes y manifestaciones reumatológicas por diversos mecanismos, entre ellos, generar autoanticuerpos contra varios autoantígenos; pueden desarrollar síndromes paraneoplásicos; o presentar un reumatismo postquimioterapia.

Por tanto, la aparición de manifestaciones autoinmunes y reumatológicas en pacientes con cáncer no es infrecuente y son el resultado de diversos mecanismos. En el presente capítulo se presenta la relación entre cáncer y autoinmunidad.

Introducción

Diversos estudios han indicado la relación entre las enfermedades reumatológicas, los fenómenos autoinmunes y el cáncer. Los pacientes con artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES) tienen un riesgo incrementado, si se comparan con la población normal, de padecer malignidades hematológicas (1,2). A la vez, la prevalencia de tumores sólidos entre los pacientes con esclerosis sistémica (ES) está entre el 3% y el 7% (3). La relación bidireccional entre autoinmunidad y cáncer ha sido recientemente revisada (4).

Los pacientes con tumores malignos pueden presentar manifestaciones de enfermedades reumatológicas y autoinmunes. Estas características pueden ser secundarias a la producción de autoanticuerpos, a la presencia de síndromes paraneoplásicos, a la invasión directa de las articulaciones y los músculos por células tumorales, o como consecuencia de quimioterapia combinada. En este capítulo se analizarán las características reumatológicas y autoinmunes de los pacientes con tumores malignos sólidos y hematológicos.

Autoanticuerpos en pacientes con cáncer

Los tumores malignos están asociados con inducción de autoinmunidad debido a la generación de autoanticuerpos contra un amplio número de autoantígenos. La actividad de los autoanticuerpos ha sido identificada en el suero de los pacientes con tumores malignos sólidos y hematológicos. La respuesta inmune antitumoral puede dar lugar a la producción de autoanticuerpos dirigidos contra varios autoantígenos, incluyendo antígenos expresados en las propias células tumorales - un gran grupo de autoantígenos designados como autoantígenos asociados a tumores- (6,7).

Durante la década pasada nuevas técnicas se desarrollaron con el fin de identificar varias oncoproteínas y glicoproteínas. Más de 400 autoantígenos han sido identificados con una nueva técnica denominada SEREX (en inglés, serological analysis of recombinant cDNA expression libraries of human tumours with autologous serum) (8).

Los autoanticuerpos asociados a tumores se unen a:

- Antígenos específicos de tejidos, incluyendo tirosina, actina, galectina-4 y gp75 (6-10).
- Receptores de membrana como la oncoproteína HER-2/neu (6).
- Antígenos restringidos de tejidos, tales como MAGE y NY-ESO-1 (7).
- Proteínas nucleares como P53 (11), c-myc (12), c-myb (13), DNA topoisomerasa II (14), CENP-F (15) y a proteínas nucleolares como NOR-90/UBF, fibrilarina y B23 (16).

La Tabla 1 muestra los distintos autoantígenos que pueden desencadenar la generación de autoanticuerpos en pacientes con cáncer.

Anticuerpos antioncoproteínas

Las oncoproteínas son proteínas codificadas por oncogenes o por genes supresores de tumores, o por ambos, y son importantes en el control del crecimiento y la diferenciación celular. Las mutaciones o la expresión inapropiada de oncoproteínas pueden dar paso a la génesis de enfermedades malignas. El suero en el 50% de los pacientes con cáncer de seno se une con la oncoproteína P185. Esta proteína es el producto de la sobreexpresión del oncogen HER/neu y es una proteína transmembrana que es muy similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Altos títulos de anti-P185 se observan en estadios tempranos de enfermedades malignas, pero también pueden ser detectados en el suero de voluntarios sanos (17). Pacientes con cáncer de colon desarrollan anticuerpos que reaccionan con la proteína P21, una proteína unidora de GTP. Otros autoanticuerpos con actividad contra otras oncoproteínas se han encontrado en el suero de pacientes con cáncer de pulmón, seno, colon y ovario. Entre estas oncoproteínas se encuentran c-myc, c-myb y l-myc (12,13,18). Anti l-myc es detectado solamente en el suero de pacientes con cáncer, mientras que anti-c-myc y anti-c-myb no son específicos de pacientes con cáncer y pueden encontrarse en el suero de voluntarios sanos y en el de pacientes con LES (12,13). El significado clínico de la detección de autoanticuerpos con acti-

Tabla 1. Autoantígenos que pueden inducir la producción de autoanticuerpos en pacientes con neoplasias.

Autoantígeno	Características del autoantígeno	Autoanticuerpo	Ref
Oncoproteínas	Proteínas codificadas por oncogenes que están involucrados en el control del crecimiento celular.	Anti-HER-2/neu	6,17
Proteínas de los genes supresores de tumor	Son proteínas codificadas por genes supresores de tumores, expresadas en los tejidos normales.	Anti-P53	19-26
Antígenos asociados a proliferación	Antígenos citoplasmáticos y nucleares asociados con la regulación del ciclo celular y la mitosis.	Anti-ciclina B1, anti-ciclina A, anti-CENP-F	28-32
Antígenos onconeurales	Antígenos encontrados normalmente en el sistema nervioso central que pueden ser expresados por células malignas.	Anti-Hu, anti-Yo	37,39
Antígenos cáncer/testículos	Normalmente encontrados en los testículos y en varias neoplasias.	Anti-NY-ESO-1, anti-MAGE-1	45,46
Enfermedades reumáticas autoinmunes	Antígenos normales nucleares y citoplasmáticos.	ANA, anti-DNA, anti-Sm	47

vidad contra oncoproteínas no es claro. Estudios posteriores ayudarán a aclarar si estos autoanticuerpos tienen valor diagnóstico, significado pronóstico y/o, si ellos pueden ser utilizados para monitorear la respuesta a un tratamiento antitumoral específico.

Genes de supresión antitumoral

La proteína supresora antitumoral P53 es una de las más estudiadas. Su papel es prevenir la carcinogénesis y la teratogénesis. Se ha observado que la proteína P53 puede llegar a ser inmunogénica en los pacientes con tumores malignos (20).

Los anticuerpos anti-P53 han sido detectados en el suero del 3% al 65% de los pacientes con cáncer (21,22). Más aún, los anticuerpos anti-P53 pueden desarrollarse meses o años antes que el diagnóstico clínico de cáncer sea hecho (23). Los anticuerpos anti-P53 se encuentran en el suero de los trabajadores expuestos a cloruro de vinilo que desarrollan angiosarcoma del hígado (24) y en el suero de fumadores pesados que tuvieron cáncer de pulmón. Estos anticuerpos también han sido detectados en el suero de los pacientes previo al diagnóstico de tumores malignos (25). En otro estudio (5,26) los anticuerpos anti-P53 fueron buscados en el suero de mineros de uranio saludables, mineros con cáncer de pulmón o con anomalías en los rayos X de tórax, mineros con LES y controles sanos. Estos anticuerpos fueron encontrados en el 18% de los mineros con probable cáncer de pulmón, en el 14% de los mineros con LES o ES, y en 7.8% de los mineros sanos. Ningunos de los pacientes con LES que no eran mineros o de las mujeres sanas de 18-62 años de edad tenían actividad anti-P53 en su suero.

En un estudio reciente, los anticuerpos anti-P53 se encontraron en el 25% de las mujeres con cáncer de ovario y su presencia en el líquido ascítico se correlacionó como marcador de mal pronóstico (27).

Los anteriores datos sugieren que los anticuerpos anti-P53 se hallan principalmente en el suero de los pacientes con cáncer. Estos anticuerpos son el resultado de un proceso de autoinmunización debido a la gran inmunogenicidad de la proteína P53, y está en relación con una mutación sin sentido del gen de la proteína P53. Estos anticuerpos tienen una especificidad del 96% y pueden ser usados para detectar tempranamente la presencia de carcinoma en pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer.

Antígenos asociados con proliferación

Los pacientes con enfermedades malignas pueden generar anticuerpos que reaccionan con antígenos que intervienen en la regulación del ciclo celular y la mitosis. Se incluyen anticuerpos contra antígenos nucleares y citoplasmáticos asociados con los procesos de rearreglo y la biosíntesis en los ribosomas. La ciclina B1, la ciclina A y la Kinasa 2 dependiente de ciclinas (en inglés, CDK) son un grupo de proteínas reguladoras del ciclo celular, que actúan en diferentes etapas. La sobreexpresión de la ciclina E y de la ciclina D1 se ha observado en las células de los pacientes con carcinoma de células escamosas de pulmón y en las células de pacientes con atipia y displasia de las células bronquiales, aumento que no se observa en las células bronquiales normales (28).

El 2% de 1.438 pacientes con diferentes neoplasias tienen anticuerpos relacionados con antígenos de la mitosis (5). Los anticuerpos que reaccionan contra las ciclinas B1 y A y contra CDK se presentaron en un 15%, 1% y 1%, respectivamente, de los pacientes con carcinoma hepatocelular (29). También anticuerpos anti-ciclina B1 fueron detectados en el suero de pacientes con hepatitis crónica activa y cirrosis.

Los pacientes con cáncer pueden producir nuevos antígenos nucleares que se unen específicamente al DNA durante el ciclo celular. El suero de los pacientes con cáncer de pulmón reacciona contra un nuevo antígeno designado SG2NA (S7G2 nuclear antigen). Este antígeno pertenece a la familia de proteínas potenciadoras semejantes a la tranducina (en inglés, TLE) la cual regula las funciones nucleares asociadas con el ciclo celular (30).

El antígeno CENP-F, también conocido como P330 y mitosina, se expresa sobretodo durante G2 y la mitosis. Interviene en la maduración del centrómero y kinetocoro, la alineación y segregación de los cromosomas, la regulación del control de la metafase, la estabilización del huso en la anafase y la citokenesis (31). Los anticuerpos anti-CENP-F se han encontrado asociados con cáncer. De 36 pacientes con anticuerpos anti-CENP-F, 22 pacientes tenían una enfermedad maligna siendo el cáncer de seno y pulmón los más frecuentes. El título promedio de los anticuerpos anti-CENP-F entre los pacientes con cáncer fue 1/10000 comparados con 1/3000 de los pacientes sin cáncer, lo que indica una gran respuesta inmune al CENP-F de los pacientes con neoplasias. Sin embargo, la frecuencia total de los anticuerpos anti-CENP-F entre los pacientes con diversos cáncer es menor al 1% (15,32).

El suero de los pacientes con cáncer puede reaccionar con antígenos asociados al proceso de rearreglo (splicing) y la biosíntesis en los ribosomas (16). Así, el suero de los pacientes con hepatoma puede unirse con el factor unidor contra corriente humano (en inglés, NOR-90/hUBF), la U3-ribonucleoproteína (U3-RNP) asociada a la fibrilarina y la proteína P23, proteínas involucradas en la biosíntesis del ribosoma (16,33). Anticuerpos que se unen a autoantígenos como a los motivos de factores de rearreglo (del inglés, splicing factor motifs (HCC1) se encuentran en el suero de los pacientes con cirrosis hepática que desarrollaron hepatoma (34), sugiriendo que varias proteínas involucradas en el rearreglo del RNA mensajero pueden ser blancos antigénicos en los pacientes con hepatoma.

Anticuerpos contra antígenos onconeurales

Los antígenos onconeurales son identificados normalmente en el sistema nervioso central, pero ellos también pueden expresarse en enfermedades malignas por activación o depresión de genes (Tabla 2). La expresión de

Tabla 2. Anticuerpos antionconeurales y su significado clínico.

Autoanticuerpo	Malignidad relacionada	Significado clínico	Ref
Anti-Hu	Cáncer de pulmón de células pequeñas	Encefalomielitis, neuropatía aguda sensitiva o autonómica, neuromiotonía	37-39, 75
Anti-VGCC	Cáncer de pulmón de células pequeñas	Síndrome de Lambert- Eaton	76,77
Anti-anfifisina	Cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer de seno, timoma	Síndrome del hombre rígido	79
Anti-Yo	Cáncer de seno, de ovario, de pulmón de células pequeñas	Degeneración cerebelar	40,41
Anti-Ri	Cáncer de seno, de ovario, de pulmón de células pequeñas	Mioclonus, degeneración cerebelar	40,42
Anti-Tr	Enfermedad de Hodgkin	Degeneración cerebelar	43,44

anticuerpos anti-onconeurales en estos pacientes puede dar paso a la presentación de síndromes paraneoplásicos (35,36).

Los antígenos Hu tienen un peso molecular de 35-40 kDA, se expresan en las neuronas y constituyen una familia de proteínas ligadoras del RNA, caracterizada por el reconocimiento de un motivo de RNA de 80 aminoácidos (37). Este antígeno también se encuentra en las células de los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas hasta en un 90%, y ha sido asociado con encefalomielitis, neuropatía sensorial, degeneración cerebelar y dismotilidad del sistema gastrointestinal, entidad clínica designada como el síndrome anti-Hu (38,39).

El suero de un alto porcentaje de pacientes con cáncer de seno o ginecológico se une con otro antígeno onconeural, llamado Yo, que se expresa en el citoplasma de las células de Purkinje cerebelares y en las células malignas. Tres tipos de antígeno Yo han sido identificados (cdr 34, cdr 62-1, cdr 62-2) y son genes correspondientes son clones. Los anticuerpos que reaccionan con el antígeno Yo han sido asociados con el desarrollo de degeneración cerebelar: un síndrome clínico caracterizado por ataxia, disartria y disfagia (40,41).

El anti-Ri es otro anticuerpo antionconeural que ha sido aislado del suero de pacientes con cáncer de seno, de pulmón de células pequeñas, ginecológico y otros tipos de cáncer. Éste se une a una proteína nuclear RNA neuronal con un peso molecular de 55-80 kDa. El anticuerpo anti-Ri se ha asociado con la presencia de degeneración cerebelar y mioclonus (40-42).

El suero de los pacientes con enfermedad de Hodgkin y degeneración cerebelar reacciona contra el antígeno Tr, un nuevo antígeno onconeural localizado en las células de Purkinje (43,44).

Anticuerpos contra antígenos cáncer/testis

Los antígenos cáncer/testis se refieren a un gran grupo de antígenos expresados en diferentes tumores. Se han encontrado 7 antígenos cáncer/testis y pertenecen a las siguientes familias de genes: MAGE, GAGE, BAGE, SSX, ESO, SCP, CT7. La familia ESO expresa el antígeno NY-ESO-1 y los anticuerpos dirigidos contra este antígeno se encuentran en pacientes con melanoma (9.4%) cáncer de ovario (12.5%), cáncer de pulmón (4.2%) y cáncer de seno (7.7%). Anticuerpos anti-MAGE-1 y SSX2 se encuentran en < 5% de los pacientes con melanoma, cáncer de ovario o pulmón (45,46).

Anticuerpos asociados con enfermedades reumáticas autoinmunes

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son detectados en el suero de los pacientes con cáncer. El suero de los pacientes con enfermedades malignas reacciona contra el DNA, las histonas, y los antígenos nucleares extractables (ENAS) Ro, La, Sm y RNP. Los anticuerpos antifosfolipídicos (aPL) y el factor reumatoideo (FR) también pueden encontrarse en estos pacientes (47,48).

Títulos elevados de aPL se encuentran en pacientes con cáncer y trombosis. La frecuencia de aPL entre los pacientes con cáncer varía. En un estudio, el 22% de los pacientes con cáncer tenían aPL positivos comparados con el 3% de los controles sanos. El riesgo de trombosis se incrementa 2 veces en los pacientes con cáncer con aPL positivo comparados con los aPL negativos (49). La actividad del anticoagulante lúpico se ha reportado en un 2 al 12% de los pacientes con cáncer (50). Los pacientes con aPL tienen un riesgo aumentado de padecer de cáncer. En un estudio de 5 años de seguimiento en 360 pacientes aPL positivos, 5 de estos desarrollaron cáncer, 4 de los cuales fueron linfoma no-Hodgkin (51).

Una alta proporción de los pacientes con neoplasias hematológicas presentan diversos autoanticuerpos. Una gran parte de los pacientes con mieloma múltiple, macroglobulinemia y leucemia linfocítica crónica son FR positivo y su suero se une al DNA, a la mielina asociada a glicoproteínas, y a otros autoantígenos. Estos autoanticuerpos son el resultado de la transformación maligna de las células B que los producen (52,53).

Los autoanticuerpos de los pacientes con enfermedades malignas hematológicas tienen la característica de ser autoanticuerpos naturales. Estos anticuerpos que no requieren un estímulo antigénico para su producción, son generados por las células B CD5+, principalmente de tipo IgM, son codificados por genes de la línea germinal y se caracterizan por su baja afinidad a diversos antígenos propios y no propios (54).

Los autoanticuerpos naturales representan en gran parte las inmunoglobulinas normales circulantes. La mayoría

de ellos pueden reaccionar con 3 o más antígenos propios o extraños y juegan un papel activo en la preservación del balance normal de la respuesta inmune. Estos anticuerpos se unen a autoantígenos defectuosos y aceleran su opsonización y fagocitosis.

Altos títulos de autoanticuerpos naturales se observan en pacientes con infecciones virales, bacterianas y parasitarias y en pacientes con enfermedades malignas hematológicas incluyendo mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, leucemia linfocítica crónica y linfoma de células B. Los anticuerpos monoclonales del suero de pacientes con neoplasias hematológicas se unen al DNA, Sm, RNP, Ro, La, I-Ag, histonas, actina, miosina entre otros (52-55). En estos pacientes, autoanticuerpos patogénicos tipo IgG también han sido reportados. A su vez, enfermedades reumatológicas autoinmunes como trombocitopenia autoinmune, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, AR, LES y enfermedades autoinmunes tiroideas han sido reportadas en estos pacientes (55).

Síndromes autoinmunes paraneoplásicos

Los síndromes paraneoplásicos representan un amplio rango de síndromes clínicos que se presentan en pacientes con cáncer. Cerca del 7% al 10% de los pacientes con cáncer desarrollan un síndrome paraneoplásico. Este puede ser el resultado de la secreción de varias hormonas o péptidos similares a las hormonas por parte de las células tumorales o por fenómenos autoinmunes (56). Por ejemplo, el síndrome de Cushing y la hipercalcemia pueden ser secundarios a la secreción ectópica de la hormona adrenocorticotropa y de proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea. Otras hormonas que pueden ser secretadas por las células tumorales son los factores de crecimiento relacionados con la insulina, la hormona antidiurética, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, la eritropoyetina, entre otras (57).

La activación de mecanismos autoinmunes en los pacientes con cáncer puede asociarse al desarrollo de enfermedades reumáticas autoinmunes. A su vez, pacientes con enfermedades autoinmunes reumatológicas, incluyendo dermatomiositis, polimiositis, vasculitis, ES, tienen un riesgo aumentado de sufrir cáncer. Sin embargo, en un gran número de pacientes la enfermedad maligna se diagnostica unos meses o años antes que la enfermedad autoinmune se manifieste.

La dermatomiosistis tiene una estrecha relación con enfermedades malignas. La miopatía inflamatoria de los músculos proximales y el compromiso de la piel y órganos internos como el pulmón, el corazón y el sistema gastrointestinal son las principales características de esta enfermedad. Cerca del 25% de los pacientes con dermatomiositis, mayores de 50 años, tienen un diagnóstico de cáncer, el cual se realiza en los 2 años siguientes al diagnóstico de la dermatomiositis (58,59). En un metaanálisis, el riesgo relativo para desarrollar un cáncer fue de 4.4 para pacientes con dermatomiositis y de 2.1 para pacientes con polimiositis (58). Las neoplasias malignas más comunes que ocurren en los pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas son el cáncer de seno y ginecológico en las mujeres y el de pulmón en los hombres. El cáncer del tracto gastrointestinal ocurre en ambos sexos.

La relación temporal entre cáncer y miopatía inflamatoria idiopática no es clara. Para algunos casos de miopatías un mecanismo paraneoplásico ha sido propuesto, basándose en la observación de una remisión completa después de la resección del tumor maligno sin el uso de corticoesteroides (58).

Los pacientes con enfermedades malignas, en especial las de tipo hematológico, pueden desarrollar varias formas de síndromes vasculíticos cutáneos, vasculitis de un solo órgano interno o una forma sistémica de vasculitis. Greer et al (60) durante 17 años de seguimiento a pacientes con distintos tipos de cáncer hematológicos, identificaron a 13 pacientes con concomitancia de vasculitis y malignidad hematológica. Sánchez-Guerrero et al (61) reportaron 11 casos de vasculitis asociadas con cáncer, 7 de los cuales tenían una neoplasia hematológica y 4 un tumor sólido. La revisión de los casos publicados de cáncer asociados con vasculitis mostró que las neoplasias más frecuentes fueron la leucemia de células peludas y el cáncer de pulmón (62). De 36 casos de tumores sólidos asociados a vasculitis, 9 pacientes tenían cáncer de pulmón (7 casos con cáncer de células no pequeñas y 2 casos con cáncer de células pequeñas) (63).

La vasculitis leucocitoclástica es la vasculitis más frecuente relacionada con neoplasias (64). La vasculitis de pequeños vasos que afecta más que todo a los vasos sanguíneos de los nervios periféricos y los músculos también es un tipo frecuente de vasculitis observada en estos pacientes. Una vasculitis similar a la poliarteritis nodosa ha sido asociada principalmente con leucemia de células peludas (65).

Así como en la dermatomiositis, existen diferentes reportes de casos de pacientes que presentan simultáneamente vasculitis y cáncer. De 29 pacientes con granulomatosis de Wegener, 14 presentaron al mismo tiempo cáncer y vasculitis (66). Otros casos reportados incluyen el diagnóstico simultáneo de vasculitis y cáncer de pulmón, vasculitis de pequeños vasos y cáncer de estómago - observación realizada basándose en el examen histológico (67). Todos estos hallazgos sugieren un mecanismo paraneoplásico para la ocurrencia de vasculitis entre los pacientes con cáncer.

Los pacientes con ES tienen un aumento en el riesgo de padecer neoplasias 2.1 veces. Los tipos de cáncer más comunes asociados con ES son los de seno y pulmón. El riesgo relativo de desarrollar cáncer de pulmón fue 8.3 y todos los pacientes que desarrollaron una neoplasia pulmonar tenían un diagnóstico previo de fibrosis pulmonar. El diagnóstico de la mayoría de las neoplasias de seno se realizó en un lapso de 2 años del diagnóstico de ES. Aunque un mecanismo paraneoplásico involucrado en la gé-

nesis de ES no ha sido reportado, la relación temporal entre el diagnóstico de esta y el cáncer de seno sugiere unas bases genéticas similares, una posible causa compartida o un síndrome paraneoplásico (3).

Entre los pacientes con síndrome de POEMS se ha reportado la ocurrencia de ES como síndrome paraneoplásico (3). Este síndrome ocurre entre los pacientes con plasmocitoma IgA y se caracteriza por polineuropatía, lesiones osteolíticas, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y manifestaciones similares al LES.

La osteoartropatía hipertrófica se ha correlacionado con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Ésta se caracteriza por un edema doloroso con entumecimiento e hipersensibilidad de las falanges distales (Figura 1). El examen histológico revela edema subperióstico y formación de hueso a lo largo de las láminas del hueso tubular de las extremidades. Se ha observado mejoría de la osteoartropatía pulmonar hipertrófica después de la quimioterapia y radioterapia (68,69).

El síndrome de Sweet es una entidad clínica caracterizada por fiebre, neutrofilia y placas cutáneas eritematosas sensibles en los brazos, el cuello y la cabeza; también puede existir compromiso musculoesquelético, pulmonar y hepático (Figura 2). Diversas neoplasias, en especial la leucemia mieloide aguda, se han asociado con este síndrome (70).

Los síndromes paraneoplásicos hematológicos autoinmunes incluyen anemia hemolítica autoinmune y trombocitopenia. Estos síndromes generalmente se presentan en los pacientes con leucemia linfocítica crónica y linfoma de células B como resultado de la secreción tanto de autoanticuerpos antiplaquetarios y de autoanticuerpos fríos y calientes antiglóbulos rojos (71,72).

La policitemia, como resultado de la secreción de eritropoyetina, se ha asociado con carcinoma renal, sarcomas y feocromocitomas (73).

Los síndromes paraneoplásicos del sistema nervioso central son poco comunes, ocurren en el 1% de los pacientes con cáncer (56). Estos síndromes son el resultado de mecanismos autoinmunes. La expresión genética de antígenos onconeurales puede dar lugar a la generación de autoanticuerpos antionconeurales, llevando a diferentes síndromes neurológicos (39,74).

La encefalomielitis es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso y ha sido reportada en los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y en pacientes con anticuerpos anti-Hu. El proceso inflamatorio puede afectar los ganglios dorsales, la médula espinal y los sistemas nerviosos autónomo y periférico (38,75,76).

El 1% al 3% de los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas desarrollan el síndrome de Lambert-Eaton caracterizado por debilidad muscular proximal, disfunción autonómica y compromiso de los nervios craneales (77). Anticuerpos contra los canales de calcio con compuertas dependientes de voltaje han sido encontrados en el suero de estos pacientes; éstos se unen a la zona activa de la presinapsis en la sinapsis colinérgica y bloquean la entrada del calcio necesaria para la liberación de la acetilcolina (78), produciéndose de esta manera la manifestación clínica.

Una neuropatía periférica autonómica, sensorial y motora puede desarrollarse en los pacientes con neoplasias.

Figura 1.
Osteoartropatía hipertrófica.
Se observa una proliferación de los tejidos blandos distales y de la matriz subungueal de los dedos de manos y pies, hallazgo semiológico conocido como hipocratismo digital.
Tomado de ACR Slide Collection on the Rheumatic Diseases, 3rd Edition.

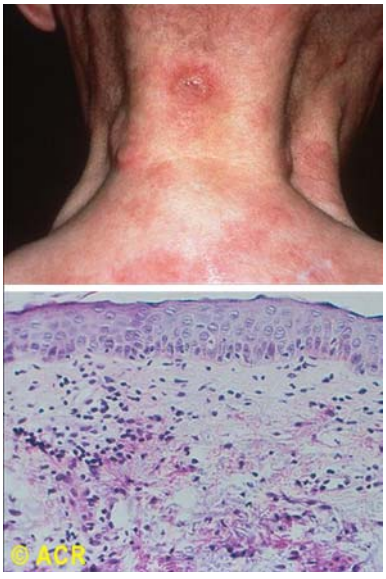


Figura 2.
Síndrome de Sweet
Lesiones papulonodulares difusas, características del síndrome de Sweet. Histológicamente se observa la dermis edematosa con un importante infiltrado de neutrófilos.
Tomado de ACR Slide Collection on the Rheumatic Diseases, 3rd Edition.

Los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas y con anticuerpos anti-Hu desarrollan una forma aguda de neuropatía sensorial rápidamente progresiva de todas las extremidades; estos pacientes también pueden presentar una polineuropatía autonómica caracterizada por gastroparesia, hipotensión postural o retención urinaria (76). Entre las neuropatías periféricas motoras asociadas con el síndrome anti-Hu se incluyen el síndrome de Guillain-Barré en los pacientes con enfermedad de Hodgkin y la neuropatía de las células del cuerno anterior en los pacientes con linfoma.

El 5% de los pacientes con macroglobulinemia de Waldenström padecen de una polineuropatía periférica. En la mayoría de estos casos el componente monoclonal se une al epítope glucuronil-sulfato de la glicoproteína asociada a mielina (MAG). La unión de anti-MAG a los nervios periféricos da paso a una neuropatía demielinizante (79). Los pacientes con mieloma múltiple pueden desarrollar una polineuropatía periférica sensitivo-motora como resultado de la unión de inmunoglobulinas monoclonales tipo IgG o IgA a antígenos humanos del endoneuro de 58, 43 y 8 kDa (80).

El síndrome del hombre rígido ("stiff man") se caracteriza por un espasmo severo de los músculos esqueléticos. Éste se ha reportado en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de seno, timomas, y se ha encontrado relacionado con anticuerpos anti-anfifisina. Estos autoanticuerpos reaccionan con una proteína de 128 kDa en la sinapsis terminal que une la proteína adaptadora del núcleo AP2 con la dinamina. La unión de este autoanticuerpo con la anfifisina previene la liberación de neurotransmisores (81). La neuromiotonía es otra entidad clínica caracterizada por rigidez y actividad prolongada en los músculos. Ésta se ha asociado con anticuerpos anti-Hu (76).

Varios síndromes paraneoplásicos de los riñones han sido reportados. La nefropatía membranosa evidenciada por la presencia de síndrome nefrótico, ha sido relacionada con neoplasias. De los casos de nefropatía membranosa idiopática, un 22% de ellos presentan un cáncer, siendo el de pulmón, colon y estómago los tipos de cáncer más frecuentes. El depósito de antígenos asociados al cáncer se ha encontrado en la membrana basal de algunos de los pacientes con cáncer y nefropatía membranosa.

Los pacientes con neoplasias linfoproliferativas, y en particular con linfoma Hodgkin, también desarrollan síndrome nefrótico, pero las características histológicas renales corresponden a una enfermedad de cambios mínimos. Esta glomerulopatía de cambios mínimos se ha reportado hasta en un 50% de los pacientes con enfermedad de Hodgkin. Entre otros síndromes paraneoplásicos renales se incluyen la glomerulonefritis rápidamente progresiva entre los pacientes con alteraciones en las células plasmáticas, y la glomerulonefritis segmentaria en los pacientes con linfoma de las células T (82).

Estos datos sugieren que la transformación maligna puede estar asociada con disregulación inmune, activación de las células B y T, y con la generación de una amplia gama de autoanticuerpos patogénicos que dan lugar a diversas manifestaciones clínicas.

Reumatismo postquimioterapia

Los pacientes con neoplasias pueden desarrollar manifestaciones reumatológicas después de la quimioterapia. El primer reporte de esta asociación fue hecho en 8 mujeres con cáncer de seno que fueron tratadas con quimioterapia coadyuvante. Todas recibieron ciclofosfamida con metotrexate y fluorouracilo o doxorubicina y fluorouracilo. Los síntomas reumatológicos aparecieron de 2 a 16 meses después de completar el tratamiento, e incluían mialgias, artralgias, artritis, inflamación periarticular y tenosinovitis. Todas las pacientes tenían una sedimentación normal y en ninguna se detectó FR (83). Otros estudios también han reportado la asociación entre la quimioterapia para cáncer de seno y los síntomas reumatológicos (84,85).

En pacientes con cáncer de ovario y linfoma no-Hodgkin también se ha observado esta asociación (85,86). En una revisión de 23 mujeres con cáncer de seno que después de la quimioterapia desarrollaron síntomas reumatológicos, una desarrolló LES. Sin embargo, esta paciente antes del diagnóstico de cáncer de seno sufría de anemia hemolítica autoinmune, sugiriendo que la quimioterapia pudo haber activado mecanismos autoinmunes (87). También se ha observado que la quimioterapia empeora los síntomas reumáticos en los pacientes que ya los presentaban antes del tratamiento.

El mecanismo de este reumatismo postquimioterapia no es claro y puede ser multifactorial. Entre los posibles mecanismos se incluyen la supresión de esteroides, la menopausia temprana o los efectos adversos de la ciclofosfamida o de los otros medicamentos usados en la quimioterapia (88). Nueve de 23 pacientes incluidos en la serie de Warner et al (87), desarrollaron síntomas reumatológicos tempranamente después de iniciar el tratamiento con tamoxifeno. En otro estudio, tres pacientes presentaron un cuadro de poliartritis inflamatoria después del tratamiento con tamoxifeno (89).

Diversas manifestaciones autoinmunes y reumatológicas se pueden presentar posterior al uso de otros agentes quimioterapéuticos. El fenómeno de Raynaud puede aparecer después del tratamiento con bleomicina, vinblastina y cisplatino (90). La isquemia y necrosis digital se han asociado al uso de 5-fluorouracilo (91). Después del tratamiento con bleomicina se han reportado manifestaciones de ES como fenómeno de Raynaud, engrosamiento de la piel y fibrosis pulmonar.

El tratamiento de neoplasias con agentes inmunomoduladores puede desencadenar un estado de autoinmunidad. El uso del interferón α se ha asociado con la generación de autoanticuerpos y la aparición de enfermedades autoinmunes (92), por ejemplo, autoanticuerpos tiroideos incluyendo antitiroglobulina y antiperoxidasa tiroidea y autoanticuerpos asociados con hepatitis autoinmune (92). También LES y otras enfermedades autoinmunes han sido

detectadas posterior al tratamiento con interferón (93-95). El desarrollo de autoinmunidad por el uso de interferón se ha correlacionado con el genotipo, específicamente con el HLA; así, el desarrollo de AR después del uso de interferón se ha observado en individuos que expresan el alelo HLA-DRB1*0404 conocido como un alelo que predispone a esta patología (96). La aparición de enfermedad autoinmune tiroidea asociada al uso de este medicamento se ha descrito más que todo en individuos que expresan el genotipo HLA DR-3 (97).

Varios casos de pacientes con alteraciones mieloproliferativas, como leucemia mieloide crónica y trombocitosis esencial, desarrollaron LES después del tratamiento con interferón α y β (93-95); y después del uso de estos mismos medicamentos 27 (20%) de 137 pacientes con estas alteraciones mieloproliferativas tuvieron síntomas reumatológicos (95). Durante el tratamiento con interferón 18 (72%) de 25 pacientes con leucemia mieloide crónica tenían ANA positivos, de ellos, 15 reportaron síntomas reumatológicos y 3 llenaron los criterios de clasificación para LES. En otro estudio, 19% de 135 pacientes con síndrome carcinoide maligno desarrollaron enfermedades autoinmunes incluyendo enfermedad tiroidea autoinmune, LES, anemia perniciosa y vasculitis (98).

Conclusión

Los datos anteriormente discutidos sugieren que manifestaciones reumatológicas y características autoinmunes ocurren en una amplia proporción de pacientes con cáncer. Esta relación entre autoinmunidad y cáncer puede ser el resultado de un origen etiológico común (genético, hormonal o factores ambientales) o por otro lado, por un mecanismo de síndrome paraneoplásico.

Un gran número de autoanticuerpos han sido identificados, pero poco se conoce acerca de su significado clínico. Aunque algunos autoanticuerpos son altamente específicos de cáncer (anti-P53, entre otros), ellos se presentan en menos del 50% de estos pacientes. Por lo tanto, no pueden ser usados como método de búsqueda para la detección temprana de cáncer. Estudios posteriores deberán realizarse para evaluar el valor diagnóstico y/o pronóstico de los autoanticuerpos que reaccionan contra oncoproteínas, genes supresores de tumores y/o antígenos asociados con proliferación.

La estrecha relación entre síndromes paraneoplásicos neurológicos y autoanticuerpos antineurales tiene una implicación terapéutica ya que el uso de gammaglobulinas y de globulinas antiidiotipos específicas suprime los niveles de anticuerpos patogénicos.

Finalmente, es importante reconocer que la combinación de quimioterapia para el tratamiento de neoplasias puede asociarse con manifestaciones reumatológicas que pueden ir desde artralgias y mialgias a una enfermedad reumatológica autoinmune.

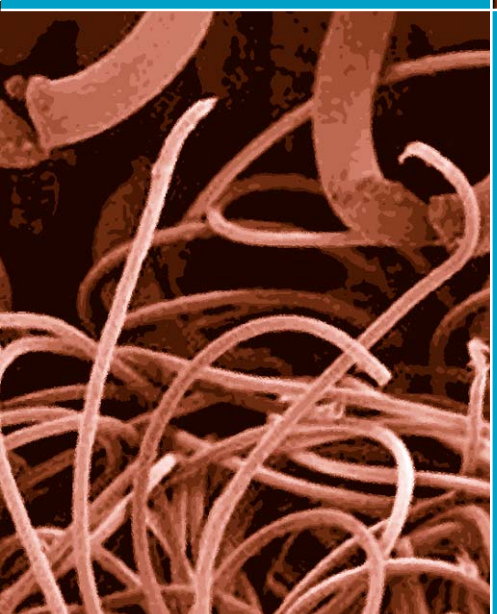
Referencias

1. Matteson EL, Hickey AR, Maguire L, Tilson HH, Urowitz MB. Occurrence of neoplasia in patients with rheumatoid arthritis enrolled in a DMARD registry. J Rheumatol 1991;18:809-14
2. Abu-Shakra M, Gladman DD, Urowitz MB. Malignancy in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996;39:1050-4
3. Abu-Shakra M, Guillemin F, Lee P. Cancer in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1993;36:460-4
4. Shoenfeld Y, Gershwin ME, eds. Cancer and autoimmunity. Amsterdam: Elsevier 2000:1-446
5. Conrad K. Autoantibodies in cancer patients and in persons with a higher risk of cancer development. In: Shoenfeld Y, Gershwin MF, eds. Cancer and autoimmunity. The Netherlands: Elsevier 2000;159–74
6. Ward S, Casey D, Labarthe MC, et al. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. Cancer Immunol Immunother 2002;51:351-7
7. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. J Exp Med 1994;180:1–4
8. Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology. J Exp Med 1998;187:1163–7
9. Leibovitch L, George J, Levi Y, Bakimer R, Shoenfeld Y. Anti-actin antibodies in sera from patients with autoimmune liver diseases and patients with carcinoma by ELISA. Immunol Lett 1995;48:129–32
10. Fishman P, Merimsky O, Baharav E, Shoenfeld Y. Tyrosinase autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier 1996:842–5
11. Angelopopulou K, Diamandis EP, Sutherland DJA, Kellen JA, Bunting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene in various cancers. Int J Cancer 1994;58:480–7
12. Ben-Mahrez K, Thierry D, Sorokine I, Danna-Muller A, Kohiyama M. Detection of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patients sera. Br J Cancer 1988;57: 529–34
13. Sorokine I, Ben-Mahrez K, Bracone A, et al. Presence of circulating anti-c-myb oncogene product antibodies in human sera. Int J Cancer 1991; 47:665–9
14. Imai H, Furuta K, Landberg G, Kiyosawa K, Liu LF, Tan EM. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in primary liver cancer. Clin Cancer Res 1995;1:417–24
15. Rattner JB, Rees J, Whitehead CM, et al. High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F. Clin Invest Med 1997;20:308–19
16. Imai H, Ochs RL, Kiyosawa K, Furuta S, Nakamura RM, Tan EM. Nucleolar antigens and autoantibodies in hepatocellular carcinoma and other malignancies. Am J Pathol 1992;140:859–70
17. Disis ML, Pupa SM, Gralow LR, Dittadi R, Menard S, Cheever MA. High titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. J Clin Oncol 1997;15:3363–7
18. Yamamoto A, Shimizu E, Ogura T, Sone S. Detection of auto-antibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients. Int J Cancer 1996;69:283–9
19. Hall PA, Lane DP. Tumor suppressors: a developing role for p53? Curr Biol 1997;7:144–7
20. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. Int J Cancer 1982;30:403–8
21. Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild CP. P53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification, and characterization. Clin Cancer Res 1995;1:1463–1469
22. Soussi T. P53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer. Cancer Res 2000;60:1777–88
23. Abendstein B, Marth C, Muller-Holzner E, Widschwendter M, Daxenbichler G, Zeimet AG. Clinical significance of serum and ascitic

P53 autoantibodies in epithelial ovarian carcinoma. Cancer 2000; 88:1432–7
24. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. Nat Med 1995;1:701–2
25. Trivers GE, Cawley HL, DeBenedetti VM, et al. Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride. J Natl Cancer Inst 1995;87:1400–7
26. Conrad K, Mehlhorn J. Diagnostic and prognostic relevance of autoantibodies in uranium miners. Int Arch Allergy Immunol 2000;123: 77–91
27. Trivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL, et al. Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. Clin Cancer Res 1996;2:1767–75
28. Lonardo F, Rusch V, Langenfeld J, Dmitrovsky E, Klimstra DS. Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. Cancer Res 1999;59:2470–6
29. Covini G, Chan EK, Nishioka M, Morshed SA, Reed SI, Tan EM. Immune response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma. Hepatology 1997;25:75–80
30. Muro Y, Chan EK, Landberg G, Tan EM. A cell-cycle nuclear autoantigen containing WD-40 motifs expressed mainly in S and G2 phase cells. Biochem Biophys Res Commun 1995;207:1029–37
31. Liao H, Winkfein RJ,Mack G, Rattner JB, Yen TJ. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. J Cell Biol 1995;130:507–18
32. Casiano CA, Humbel RL, Peebles C, Covini G, Tan EM. Autoimmunity to the cell cycle dependent centromere protein p330/CENP-F in disorders associated with cell proliferation. J Autoimmun 1995;8:575–86
33. Imai H, Fritzler MJ, Neri R, Bombardieri S, Tan EM, Chan EKL. Immunocytochemical characterization of human NOR-90 and associated antigens reactive with autoimmune sera. Mol Biol Rep 1994; 19:115–24
34. Imai H, Chan EKL, Kiyosawa K, Tan EM. Novel nuclear autoantigen with splicing factor motifs identified with antibody from hepatocellular carcinoma. J Clin Invest 1993;92: 2419–26
35. Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. Semin Oncol 1997;24:318–28.
36. Posner JB, Dalmau JO. Paraneoplastic syndromes of the nervous system. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2000;38:117–22
37. Marusich M, Furneaux H, Henion P, Weston J. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. J Neurobiol 1994;25: 143–55
38. Lucchinetti CF, Kimmel DW, Lennon VA. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear autoantibodies. Neurology 1998;50: 652–7
39. Benyahia B, Liblau R, Merle-Beral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY. Cell mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. Ann Neurol 1999;45:162–7
40. Drlicek M, Bianchi G, Bogliun G, et al. Antibodies of the anti-Yo and anti-Ri type in the absence of paraneoplastic neurological syndromes: a long-term survey of ovarian cancer patients. J Neurol 1997;244:85–9
41. Fathallah-Shaykh H, Wolf S, Wong E, Posner JB, Furneaux HM. Cloning of leucine zipper protein recognized by the sera of patients with antibody-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. Proc Natl Acad Sci 1991;88:3451–4
42. Buckanovick R, DRNAell R. The neuronal RNA binding protein NOVA-1 recognized specific RNA targets in vitro and in vivo. Am Soc Microbiol 1997;17:3194–201.
43. Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Dewsom-Davis J. Incidence of serum anti-p/o type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. J Neurol Sci 1997;147:35–42
44. Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, et al. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. J Neuroimmunol 1997;74:55–61
45. Stockert E, Jager E, Chen YT, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. J Exp Med 1998;187:1349–54
46. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. J Exp Med 1998;187: 265–70
47. Swissa M, Amital-Teplitzky H, Haim N, Cohen Y, Shoenfeld Y. Autoantibodies in neoplasia. An unresolved enigma. Cancer 1990;65: 2554–8
48. Tomer Y, Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoantibodies, autoimmunity and cancer. Oncol Rep 1998;5:753–61
49. Zuckerman E, Toubi E, Golan TD, et al. Increased thromboembolic incidence in anticardiolipin-positive patients with malignancy. Br J Cancer 1995;72:447–51
50. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies, anticardiolipin and lupus anticoagulant in SLE and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. Ann Intern Med 1990;112:682–98
51. Finazzi G. The Italian registry of antiphospholipid antibodies. Haematologica 1997;82:101–5
52. Dighiero G. Autoimmunity and B-cell malignancies. Hematol Cell Ther 1998;40:1–9
53. Swissa M, Cohen Y, Shoenfeld Y. Autoantibodies in the sera of patients with lymphoma. Leuk Lymphoma 1992;7:117–22
54. Jonsson V, Wiik A, Hou-Jensen K, et al. Autoimmunity and extranodal lymphocytic infiltrates in lymphoproliferative disorders. J Intern Med 1999;245:277–86
55. Abu-Shakra M, Shoenfeld Y. Introduction to natural autoantibodies. In: Shoenfeld Y, Isenberg D, eds. Natural autoantibodies. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1993:15–33
56. Tishler M, Shoenfeld Y. Paraneoplastic syndromes. In: Shoenfeld Y, Fishman P, Gershwin ME, eds. Cancer and autoimmunity. Amsterdam: Elsevier, 2000:121–33
57. Odell WD. Endocrine/metabolic syndromes of cancer. Semin Oncol 1997; 24:299–317
58. Zantos D, Zhang Y, Felson D. The overall and temporal association of cancer with polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 1994; 21:1855–9.
59. Sigurgerirsson B, Lindelof B, Edhag O, Allander-E. Risk of cancer in patients with dermatomyositis or polymyositis. A population based study. N Engl J Med 1992;326:363–7
60. Greer JM, Longley S, Edwards L, Elfenbein GJ, Panush RS. Vasculitis associated with malignancy. Experience with 13 patients and literature review. Medicine (Baltimore) 1988;67:220–30
61. Sánchez-Guerrero J, Gutiérrez-Urena S, Vidaller A, Reyes E, Iglesias A, Alarcón-Segovia D. Vasculitis as a paraneoplastic syndrome. Report of 11 cases and review of the literature. J Rheumatol 1990;17: 1458–1462
62. Mertz LE, Conn DL. Vasculitis associated with malignancy. Curr Opin Rheumatol 1992;4:90–3
63. Kurzrock R, Cohen PR. Clinical manifestations of vasculitis in patients with solid tumors. Arch Intern Med 1994;154: 334–42
64. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Salvarani C, Hunder GG. Cutaneous vasculitis and cancer: a clinical approach. Clin Exp Rheumatol 2000;18:305-7
65. Gabriel SE, Conn DL, Phyliky RL, Pittelkow MR, Scott RE. Vasculitis in hairy cell leukemia: review of literature and consideration of possible pathogenic mechanisms. J Rheumatol 1986;13:1167–72
66. Tatsis E, Reinhold-Keller E, Mistry N, Gross WL. Wegener's granulomatosis and malignancy: is there an association? Arthritis Rheum 1994;37:408
67. Yamada T, Miwa H, Ikeda K, et al. Polyarteritis nodosa associated with gastric carcinoma and hepatitis B virus infection. J Clin Gastroenterol 1997;25:535–7
68. Martinez-Lavin M, Martucci-Cernic MM, Jajic I, Pineda C. Hypertrophic osteoarthropathy: consensus on its definition, classification, assessment and diagnostic criteria. J Rheumatol 1993;20:1386–7
69. Shapiro LM, Mackinnon J. The resolution of hypertrophic pulmonary osteoarthropathy following treatment of subcutaneous bacterial endocarditis. Postgrad Med J 1980;56:513–15
70. Paydas S, Sahin B, Zorludemir S. Sweet's syndrome accompanying leukaemia: seven cases and review of the literature. Leuk Res 2000; 24:83–6
71. Kaden BR, Rosse WF, Hauch TW. Immune thrombocytopenia in lymphoproliferative diseases. Blood 1979 ;53:545– 51
72. Moliterno AR, Spivak JL. Anemia of cancer.Hematol Oncol Clin North Am 1996;10:345–63
73. Staszewski H. Hematological paraneoplastic syndromes. Semin Oncol 1997;24:329–33
74. Grisold W, Drlicek M. Paraneoplastic neuropathy. Curr Opin Neurol 1999;12:617–25
75. Toepfer M, Schroeder M, Unger JW, Lochmuller H, Pongratz D, Muller-Felber W. Neuromyotonia, myocloni, sensory neuropathy and cerebellar symptoms in a patient with antibodies to neuronal nucleoproteins (anti-Huantibodies). Clin Neurol Neurosurg 1999;101:207–9
76. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. Medicine (Baltimore) 1992;71:59–72
77. O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert- Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. Brain 1988;111:577–96
78. Waterman SA. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. Prog Neurobiol 2000;60:181–210
79. Saito T, Sherman W, Latov N. Specificity and idiotype of M-protein

that react with MAG in patients with neuropathy. J Immunol 1983; 130:2496–502
80. Kyle RA. Clinical aspects of multiple myeloma and related disorders including amyloidosis. Pathol Biol (Paris). 1999;47:148-57
81. Folli F, Solimena M, Cofiell R, et al. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. N Engl J Med 1993;328:546–51
82. Morris SH. Paraneoplastic glomerulopathies. Semin Nephrol 1993;13: 258–72
83. Loprinzi CL, Duffy J, Ingle JN. Postchemotherapy rheumatism. J Clin Oncol 1993;11:768–70
84. Smith DE. Additional cases of postchemotherapy rheumatism. J Clin Oncol 1993;11:1625–6
85. Michl I, Zielinski CC. More postchemotherapy rheumatism. J Clin Oncol 1993;11:2051–2
86. Raderer M, Scheithauer W. Postchemotherapy rheumatism following adjuvant therapy for ovarian cancer. Scand J Rheumatol 1994;23: 291–2
87. WRNAer E, Keshavjee al-N, Shupak R, Bellini A. Rheumatic symptoms following adjuvant therapy for breast cancer. Am J Clin Oncol 1997; 20:322–6
88. Amft N, D'Cruz D. Postchemotherapy connective tissue diseases-more than just rheumatism? Lupus 1996;5: 255–6
89. Creamer P, Lim K, George E, Dieppe P. Acute inflammatory polyarthritis in association with tamoxifen. Br J Rheumatol 1994;33:583–5
90. Vogelzang NJ, Bosl GJ, Johnson K, Kennedy BJ. Raynaud's phenomenon: a common toxicity after combination chemotherapy for testicular cancer. Ann Intern Med 1981;95:288–92
91. Papamichael D, Amft N, Slevin ML, D'Cruz D. 5-Fluorouracil-induced Raynaud's phenomenon. Eur J Cancer 1998;34:1983
92. Dumoulin FL, Leifeld L, Sauerbruch T, Spengler U. Autoimmunity induced by interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. Biomed Pharmacother 1999;53:242–54
93. Morris LF, Lemak NA, RNAett FC, Jordon RE, Duvic M. SLE diagnosed during interferon alfa therapy. SouthMed J 1996;89:810–14
94. Levesque MC, Ward FE, Jeffery DR, Weinberg JB. Interferon beta1 induced polyarthritis in a patient with the HLA-DRB1*0404 allele. Arthritis Rheum 1999;42:569–73
95. Wandl UB, Nagel-Hiemke M, May D, et al. Lupus like autoimmune disease induced by interferon therapy for myeloproliferative disorders. Clin Immunol Immunopathol 1992;65:70–4
96. Levesque MC, Ward FE, Jeffery DR, Weinberg JB. Interferon-beta1A-induced polyarthritis in a patient with the HLA-DR*0404 allele. Arthritis Rheum 1999;42:569-73
97. Manns MP, Rambusch EG. Autoinmmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. J Hepatol 1999;31:39-42
98. Ronnblom LE, Alm-GV, Oberg KE. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid. Ann Intern Med 1991;115:178–83

SECCIÓN III

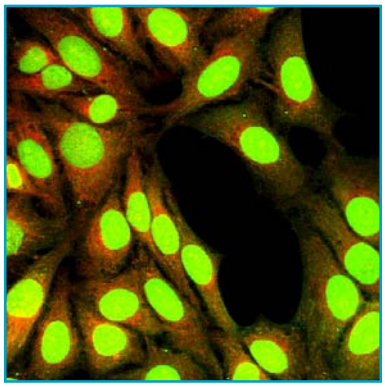


Enfermedades Autoinmunes

22

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Juan-Manuel Anaya
Gabriel Jaime Tobón
Ricardo Pineda-Tamayo
Josep Font
Ricard Cervera



Contenido

Epidemiología
Diagnóstico y clasificación
Etiología y patogenia
- Susceptibilidad genética
- Anticuerpos
- Trastornos linfocitarios
- Citoquinas
- Regulación inmune
- Apoptosis
- Complemento
- Inmunoendocrinología
- Medio ambiente

Patología
Manifestaciones clínicas
Actividad de la enfermedad
Tratamiento
Pronóstico

El Lupus Eritematoso Sistémico es el prototipo de las enfermedades autoinmunes no-órgano específicas, y se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que varían de un paciente a otro. Su etiología es desconocida; sin embargo, factores genéticos que interactúan con factores inmunológicos, hormonales y ambientales participan en el desarrollo de la misma. En el presente capítulo se describen y analizan estos factores y se resumen las características clínicas y las principales terapias.

Introducción

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son un grupo frecuente de entidades con un posible origen común y cuya patología varía en función del órgano o sistema afectado. Su etiología es desconocida. Si se toma el conjunto de las EAI, su prevalencia alcanza el 5% (1,2). Se pueden definir como síndromes clínicos causados por la activación de células B y/o T, en ausencia de una causa evidente (ej. infección, cáncer) (3). Se clasifican en dos grupos de acuerdo a su extensión: 1) órgano-específicas, como la tiroiditis de Hashimoto, cuyo proceso inflamatorio está limitado a la glándula tiroides y 2) no-órgano específicas o sistémicas, donde el proceso puede afectar varios órganos.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de las EAI no-órgano específicas, caracterizada por un proceso inflamatorio crónico y daño en diferentes órganos y sistemas debido, principalmente, al depósito de complejos inmunes y activación del sistema de complemento. Su curso clínico está caracterizado por períodos de exacerbaciones y remisiones. El mecanismo patogénico de la enfermedad probablemente resulte de la interacción de factores genéticos, inmunológicos, endocrinos y ambientales.

El término "lupus", acuñado por Cazenave en Francia, describe el brote facial típico que se reconoció como característico de la enfermedad. En 1980, William Osler llamó la atención sobre el compromiso de otros órganos distintos a la piel. En 1948, Hargraves describió las células LE, lo que representó uno de los mayores avances en la comprensión de la enfermedad. Este fenómeno consiste en la visualización de leucocitos que fagocitan otros leucocitos y en donde los núcleos de aquellos que son fagocitados permanecen intactos. Al principio se conocía muy poco sobre los mecanismos implicados en el desarrollo del fenómeno LE. Sin embargo, este hallazgo fue la base para el entendimiento inicial de la enfermedad como un proceso autoinmune.

Epidemiología

El LES afecta, sobre todo, el género femenino, con una relación mujer: hombre de 9 a 1. Su mayor incidencia se presenta entre la segunda y la quinta décadas de la vida, aunque se puede manifestar en edades extremas, con características clínicas e inmunológicas particulares (4-6). Su incidencia y prevalencia varían según las poblaciones estudiadas, la edad y el año de realización del estudio (7). En los Estados Unidos la incidencia varía entre 1.8 y 7.6 casos por 100.000 personas por año (Tabla 1) (8-14). La prevalencia de la enfermedad se ha reportado entre 14.6 y 50.8 por 100.000 habitantes (Tabla 2) (8-10). No existen datos epidemiológicos sobre estos aspectos en poblaciones latinoamericanas. La enfermedad es más común en poblaciones afronorteamericanas que en poblaciones caucásicas. Los primeros tienen una incidencia aproximadamente cinco veces mayor que los últimos (15,16).

La prevalencia del LES se incrementa desde África hacia Europa, un fenómeno conocido como la hipótesis de "gradiente de prevalencia" (17,18). Los iniciadores potenciales de este gradiente incluyen diversos factores genéticos y ambientales como diferencias nutricionales o exposición a patógenos.

El curso clínico de la enfermedad también varía entre las poblaciones. En un estudio europeo, de la cohorte del "European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus", el 25% de los pacientes murieron como consecuencia de una infección (19,20). Se encontró en este mismo grupo una probabilidad de sobrevivencia del 92% a los diez años. En pacientes Brasileros, la infección fue la causa de la muerte en un 58% de los casos (21,22). La raza también podría explicar estas diferencias en el curso clínico. Los resultados del estudio LUMINA (23) indicaron que en pacientes hispánicos la actividad de la enfermedad fue la causa de muerte en un 80% de los casos; mientras que en los pacientes afronorteamericanos la infección fue la causa de muerte en el 50% de los casos. El estudio GLADEL, el cual evaluó el comportamiento del LES en pacientes de América Latina, mostró que aquellos de raza mestiza y afrolatinoamericanos tuvieron mayor presentación de enfermedad renal, pericarditis y lesiones discoides que los pacientes de raza blanca (24). Además, otros estudios han demostrado la mayor presencia de nefritis lúpica en población hispana y afronorteamericana que en caucásicos (25,26) y un daño orgánico más rápido que en las otras poblaciones (27).

Tabla 1. Incidencia de LES calculada por género y raza en los Estados Unidos.

Autor [ref]	Fecha	Incidencia por 100.000 personas por año				
		HB	MB	HAA	MAA	Total
Siegel [8]	1956-65	0.3	2.5	1.1	8.1	2.0
Fessel [9]	1965-73	ND	ND	ND	ND	7.6
Michet [10]	1950-79	0.9	2.5	ND	ND	1.8
Michet [10]	1970-79	0.8	3.4	ND	ND	2.2
Hochberg [11]	1970-77	0.4	3.9	2.5	11.4	4.6
McCarty [12]	1985-90	0.4	3.5	0.7	9.2	2.4

HB: Hombres blancos; MB: mujeres blancas; HAA: Hombres afronorteamericanos; MAA: Mujeres afronorteamericanas. ND: no dato.

Tabla 2. Prevalencia de LES calculada por género y raza en los Estados Unidos.

Autor [ref]	Fecha	Incidencia por 100.000 personas por año				
		HB	MB	HAA	MAA	Total
Siegel [8]	1965	3	17	3	56	14.6
Fessel [9]	1973	7	71	53	283	50.8
Michet [10]	1980	19	54	ND	ND	40.0

HB: Hombres blancos; MB: mujeres blancas; HAA: Hombres afronorteamericanos; MAA: Mujeres afronorteamericanas. ND: no dato.

Diagnóstico y clasificación

Para su diagnóstico se requiere considerar los signos y síntomas clínicos, las pruebas de laboratorio, y antecedentes

de exposición a fármacos o tóxicos asociados con la inducción de la enfermedad, así como la historia familiar de EAI. En algunas ocasiones, debido a su amplio espectro de manifestaciones clínicas y a la alternancia entre períodos de exacerbación y remisión, el diagnóstico de LES puede no ser evidente. Además, existen otras enfermedades que semejan al LES.

Desde 1971 se han establecido criterios de clasificación de la enfermedad con el fin de establecer parámetros de comparación similares en las diferentes poblaciones, principalmente para la inclusión de pacientes en estudios clínicos. Una primera modificación fue realizada en 1982 y la última fue hecha en 1997 (28,29) (Tabla 3). La presencia de cuatro o más criterios, en forma sucesiva o simultánea durante cualquier período de observación, permite clasificar a un paciente con LES (29). De estos criterios el más importante es la presencia de autoanticuerpos contra diversos componentes nucleares. Si bien los anticuerpos antinucleares (ANAs) tienen una alta sensibilidad, su especificidad es baja debido a que se pueden encontrar en otras EAI e incluso en población sana. Por el contrario, los anticuerpos dirigidos contra el DNA de doble cadena o DNA nativo y contra el antígeno Smith (Sm) son muy específicos de la enfermedad.

Etiología y patogenia

Los hallazgos patológicos primarios presentes en pacientes con LES son más que todo debidos a inflamación, vasculitis, depósitos de complejos inmunes y vasculopatía (Figura 1). Como se mencionó, factores genéticos, ambientales y hormonales participan en el desarrollo de la patología (Figura 2). El LES muestra una importante agregación familiar, con una frecuencia más alta de la enfermedad en los familiares de primer grado de los pacientes. Además, en las familias de pacientes con LES pueden observarse otras EAI como la anemia hemolítica, la tiroiditis autoinmune y la artritis reumatoide, entre otras (30). Los factores genéticos son importantes en la predisposición a la enfermedad pero no indispensables, en efecto, la concordancia de LES en gemelos monocigotos es muy superior a la observada en gemelos dicigotos (31). Sin embargo, la mayoría de los casos de LES son esporádicos, lo que apoya la idea de una etiología multifactorial, en la que factores ambientales también participan.

Tabla 3. Criterios clasificatorios de LES

1. Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado, localizado sobre las eminencias malares, con tendencia a respetar el surco nasogeniano.
2. Lupus discoide	Lesiones cutáneas eritematosas en parches y elevadas, con hiperqueratosis y taponamiento folicular. En lesiones antiguas se puede observar atrofia.
3. Fotosensibilidad	Brote cutáneo secundario a una reacción inusual a la exposición a la luz solar, por historia del paciente u observación del clínico.
4. Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, usualmente con poco dolor, observada por el clínico.
5. Artritis	Artritis no erosiva que compromete dos o más articulaciones periféricas, caracterizadas por edema y dolor.
6. Serositis	(a) Pleuritis- historia de dolor tipo pleurítico, o auscultación del frote pleural por parte del médico, o evidencia de derrame pleural, ó (b) Pericarditis- documentada por electrocardiograma o frote o evidencia de derrame pericárdico.
7. Compromiso renal	(a) Proteinuria persistente mayor de 0.5 gramos por día o mayor de 3+ si no se cuantifica ó (b) Cilindros celulares- pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
8. Compromiso neurológico	(a) Convulsiones-en ausencia de fármacos o causas metabólicas (ejemplos: uremia, cetoacidosis o trastornos de electrolitos) que expliquen la patología, ó (b) Psicosis- en ausencia de fármacos o causas metabólicas (ejemplos: uremia, cetoacidosis o trastornos de electrolitos) que expliquen la patología.
9. Compromiso hematológico	(a) Anemia hemolítica-con reticulocitosis, ó (b) Leucopenia: menos de 4000/mm^3 totales en dos o más ocasiones, ó (c) Linfopenia: menos de 1500/ mm^3 en dos o más ocasiones, ó (d) Trombocitopenia: menos de 100.000/mm^3 en ausencia de fármacos que expliquen el cuadro
10. Desorden inmunológico	(a) Anti-DNA- anticuerpos contra el DNA nativo, ó (b) Anti-Sm- presencia de anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm, ó (c) Hallazgos positivos de anticuerpos antifosfolipídicos basados en: (1) una concentración anormal en el suero de anticuerpos anticardiolipinas IgG ó IgM, (2) un resultado positivo para la determinación de anticoagulante lúpico usando una prueba estándar ó (3) una prueba falsa positiva para sífilis al menos durante 6 meses y confirmada por pruebas de inmovilización del Treponema pallidum o pruebas de anticuerpos contra treponema por fluorescencia.
11. Anticuerpos antinucleares	Un título anormal de anticuerpos antinucleares determinados por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en cualquier momento en ausencia de fármacos conocidos como asociados al síndrome de lupus inducido por medicamentos.

Tomado de ref. 29.

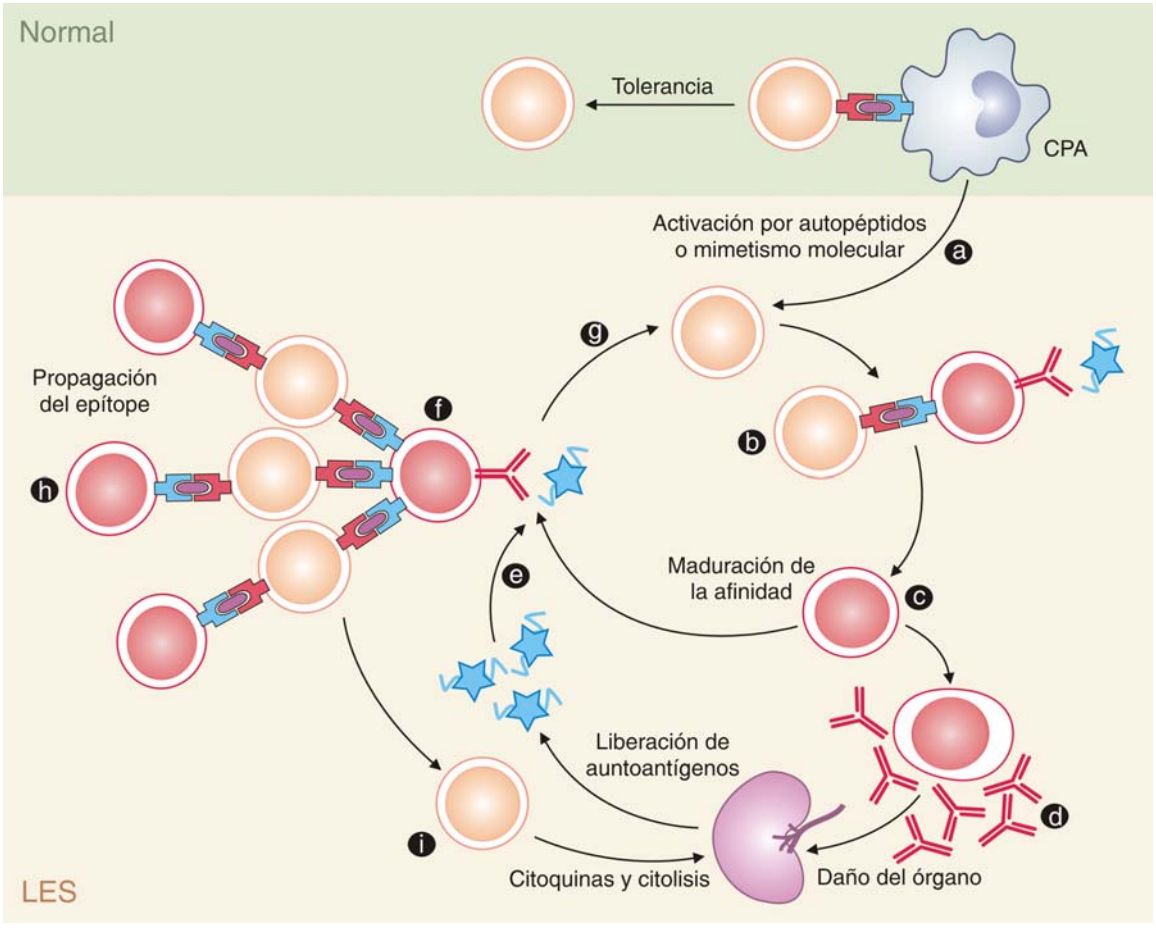


FIGURA 1.
Mecanismos para la inducción y amplificación de la autoinmunidad en LES.
a. Aunque las células T normales expuestas a autoantígenos en la periferia se convierten en tolerantes, las células T susceptibles en lupus son sensibles a umbrales más bajos de activación por agonistas o péptidos agonistas débiles. b. Una vez activadas, las células T pueden promover una estimulación de las células B genéticamente más respondedoras. c. Estas células B estimuladas por autoantígenos sufren una hipermutación somática y maduración de la afinidad. d. Durante la síntesis de autoanticuerpos patogénicos, el daño tisular genera mayor liberación de autoantígenos, e,f. que también son reconocidos y presentados por células B presentadoras de antígenos específicas, en una segunda fase de activación de las células T, g. llevando así a un ciclo de retroalimentación positiva. h. Las respuestas autoinmunes T y B son diversificadas resultando en una propagación del antígeno. Esta interacción entre células B y T conducen al proceso autoinmune. i. Las células T activadas pueden también directamente causar daño, debido a la migración al órgano blanco, a la liberación de citoquinas y por citotoxicidad directa.
LES: lupus eritematoso sistémico; CPA: célula presentadora de antígenos.
Adaptado de ref. 169.

Susceptibilidad genética

Desde el punto de vista genético esta es una enfermedad compleja, en donde múltiples genes contribuyen a la susceptibilidad de la patología (ver Capítulo 17). Sólo en una pequeña proporción de pacientes (menos del 5%) un único gen pudiera ser el responsable del LES. Tal es el caso de los pacientes con deficiencias homocigóticas de factores del complemento (32). Se estima que al menos cuatro genes de susceptibilidad son necesarios para conferir susceptibilidad a la enfermedad (33). Los más estudiados son aquellos ubicados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (31-36).

Sumado a genes del MHC, varios genes no-MHC son candidatos. Éstos incluyen, entre otros, los genes que codifican para la proteína ligadora de manosa (MBP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleuquina 6 (IL-6), IL-1 (37), proteína C reactiva (38), FcγRIIA y FcγRIIIA, y proteínas de choque térmico (ver Capítulo 19). Varios de estos genes se han encontrado asociados tanto en la población europea (39) como en la población colombiana (40-43). Sin embargo, la replicación de los estudios es diversa debido, en parte, a que el polimorfismo de estos genes varía entre las poblaciones. De otra parte, estos genes pueden también conferir susceptibilidad para la presentación de subtipos clínicos. Tal es el caso del polimorfismo del FcγRIIA, el cual ha sido asociado con nefritis lúpica en poblaciones afronorteamericanas y en coreanos (44,45). Así mismo, el polimorfismo del FcγRIIIA ha sido asociado con LES en hispanos y caucásicos (46,47). En la Tabla 4, se resumen los genes involucrados en el desarrollo o susceptibilidad al LES en humanos (48).

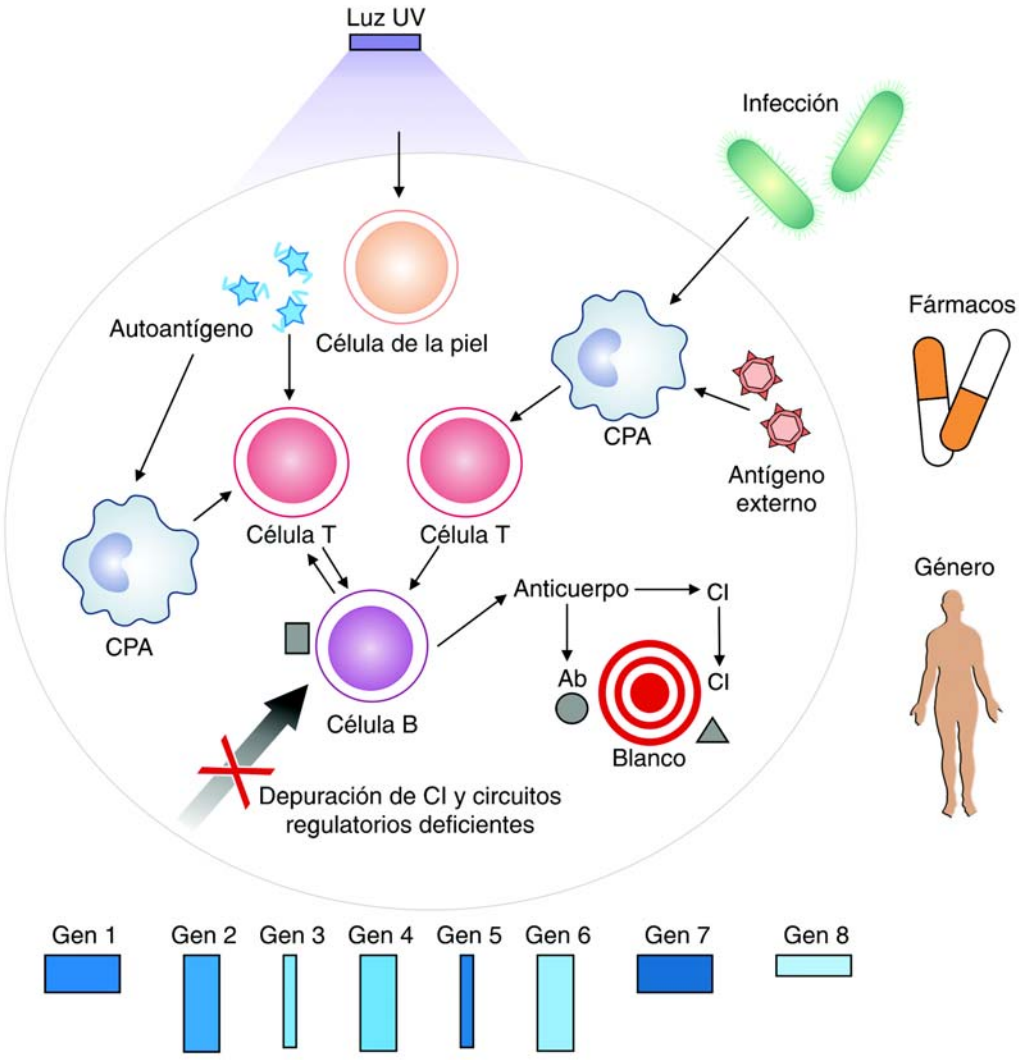


FIGURA 2. Patogénesis del LES.
Las anormalidades inmunes que caracterizan la enfermedad están representadas en cuadros para mostrar los genes de susceptibilidad (o protección) y posibles estímulos ambientales que disparan la respuesta inmune. Los factores externos introducen sus propios antígenos para ser procesados por células presentadoras de antígenos y así ellos pueden causar apoptosis, activación o muerte de las células del hospedero, llevando a la liberación de autoantígenos (ejemplos, nucleosomas, U1 RNP, y Ro/SS-A), que pueden ser procesados por células presentadoras de antígenos y células B. Estos péptidos procesados estimulan las células T y se unen a receptores de antígenos en las células B, llevando a la producción de autoanticuerpos patogénicos, los cuáles pueden unirse con el antígeno para formar complejos inmunes patológicos. Las células blanco (glomérulo, células endoteliales y plaquetas) liberan posteriormente más autoantígenos para perpetuar el proceso. Mientras tanto, los múltiples circuitos regulatorios que se suponen alteran esta respuesta contra lo propio para que esta no sea nociva, son ineficaces. Se cree que múltiples genes controlan cada una de estas respuestas- incluyendo genes para respuestas de hiperreactividad de células T y B, características de las células blanco, y la incapacidad para montar una respuesta regulatoria, como la depuración de los complejos inmunes y las células T regulatorias.

TABLA 4. Genes involucrados en el desarrollo del LES.

HLA
DR2 (DRB1*15, DRB1*16), DR3 (Riesgo relativo 2-5)
DR2, DR3, DR7, DQ1 (DQA1, DQB1), B8 (Anti-Ro)
DR3, DR8, DR12 (Anti-La)
DR3, DQ2, DQA1, DQB1, B8 (Anti-Ro y Anti-La)
DR2, DR3, DR7, DQB1 (Anti-DNA)
DR2, DR4, DQ5, DQ8, DQA1, DQB1 (anti- U1 ribonucleoproteína)
DR2, DR4, DR7, DQ6, B61 (Anti-Sm)
DR4, DR7, DQ6, DQ7, DQ8, DQ9 (anticardiolipina o anticoagulante lúpico)
Genes del complemento (C2, C4,C1q)
No-HLA
Lectina ligadora de manosa
TNF
Receptor de células T
Interleuquina 6
CR1
Inmunoglobulina Gm y Km
FcγRIIA (Receptor Fc IgG)
FcγRIIIA (Receptor Fc IgG)
PARP (Polimerasa ribosa poli-ADP)
Proteína de choque térmico 70
Humhr 3005

Los estudios de ligamiento (ver Capítulo 17) han demostrado varias regiones cromosómicas de interés. Hasta la fecha, al menos 13 sitios cromosómicos mayores muestran una evidencia significativa de ligamiento (Tabla 5). Estos ligamientos no han sido replicados en todas las poblaciones y estudios. No obstante, algunas regiones se han encontrado ligadas a otras EAI, sugiriendo el origen genético común para diversas EAI con fenotipos diferentes (49).

TABLA 5. Estudios de ligamiento replicados en LES.

Ligamiento mayor (cM)	Gen (es) asociado (s)	Etnicidad/ asociaciones
1q23	FcγRIIA, FcγRIIIA	AA, EA
1q41	No conocido	EA, HIS
2q34	No conocido	AA (nefritis)
2q37	PD-1	EU,MEX
4p16	No conocido	EA
5p15	No conocido	EA,AA, HIS (poliartritis)
6p11-21	HLA-DR	EA
10q22	No conocido	EA (nefritis)
11p13	No conocido	AA (trombocitopenia)
11q14	No conocido	AA (anemia hemolítica)
12q24	No conocido	HIS, EA
16q13	No conocido	EA,AA,HIS
17p12	No conocido	EA (vitiligo)

AA: Africanonorteamericanos; EA: Europeo-americanos; HIS: Hispánicos; EU: Europeos, Mex: Mejicanos. Adaptado de ref. 49.

Anticuerpos

El principal trastorno inmunológico en los pacientes con LES es la producción de autoanticuerpos dirigidos contra una variedad de moléculas encontradas en el núcleo, citoplasma y superficie celular, además de moléculas solubles como la inmunoglobulina G y factores de la coagulación. Los ANAs son los más característicos y están presentes en más del 95% de los pacientes. Los anticuerpos anti-DNA nativo y anti-Sm son los más específicos (29). El antígeno Sm es una pequeña ribonucleoproteína (snRNP) compuesta de un único grupo de moléculas de RNA ricas en uridina ligadas a un grupo común de proteínas centrales y otras proteínas asociadas con moléculas del RNA. Los anticuerpos anti-Sm reaccionan contra proteínas centrales snRNP, mientras que los anticuerpos anti-DNA lo hacen contra determinantes antigénicos conservados, presentes ampliamente en el DNA. Los anti-DNA se pueden aislar de los glomérulos de los pacientes con nefritis lúpica activa, e incluso pueden inducir el desarrollo de la misma en ratones normales y con inmunodeficiencia combinada severa (50,51). Su responsabilidad en la nefritis está documentada por varias evidencias: primero, los títulos varían de acuerdo con la actividad de la enfermedad renal y con el consumo del complemento (52). Segundo, los anticuerpos anti-DNA muestran un depósito preferencial en los riñones, sugiriendo que la formación de complejos inmunes es un importante mediador inflamatorio en el daño renal (53). Estos anticuerpos pueden unirse a fragmentos de DNA adheridos en la membrana basal glomerular por medio de las histonas o interactuar con otros antígenos presentes en el glomérulo como el C1q, los nucleosomas, el heparán sulfato y la laminina, entre otros (54). Esta unión puede desencadenar el proceso inflamatorio inicial y la activación del complemento. Sin embargo, la asociación entre los niveles de anti-DNA y nefritis no es absoluta. Sólo ciertos tipos de anticuerpos anti-DNA son patogénicos (52). Algunos pacientes con nefritis lúpica activa no tienen anticuerpos anti-DNA, mientras otros que poseen estos anticuerpos e incluso a títulos altos no tienen compromiso renal. Sus propiedades como el isotipo, la capacidad para fijar el complemento y su capacidad para unirse al tejido glomerular explican estas discrepancias (50).

Aunque se ha determinado la asociación de otros autoanticuerpos con algunas manifestaciones clínicas, el mecanismo por el cual éstos son patogénicos es aún incierto. Otros anticuerpos encontrados en pacientes con LES son los anticuerpos anticromatina (o antinucleosomas), observados en general en el 75% de los pacientes y en el 100% de aquellos con lupus inducido por medicamentos, pero también entre el 20% y el 50% de los pacientes con hepatitis autoinmune tipo I (55).

Los anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo (ANCAs) se han reportado en el 16% de los pacientes con LES, y se asocian con algunas manifestaciones clínicas como serositis, trombosis venosa y artritis (56). Muchos otros anticuerpos han sido reportados, más de 100 (57); no obstante, el uso e interpretación racional de unos pocos son suficientes para el estudio de pacientes con LES (Tabla 6) (58).

Trastornos linfocitarios

El LES se caracteriza por una alteración del sistema inmunológico, que resulta en activación policlonal de las células B, síntesis de autoanticuerpos, hipergammaglobulinemia y formación de complejos inmunes. La activación de las células B y T requiere del estimulo por parte de antígenos específicos. Sustancias químicas como la pristina, el DNA bacteriano y fosfolípidos de la membrana celular, y agentes virales pueden inducir la síntesis de anticuerpos anti-DNA en ratones (52). Por otra parte, autoantígenos como los complejos DNA-proteína y RNA-proteína pueden también inducir la síntesis de autoanticuerpos (59). Los antígenos ambientales y los autoantígenos son reconocidos por las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) o se unen a anticuerpos presentes en la superficie de células B.

La activación de los linfocitos B es anormal en los pacientes con LES (60). El número de estas células, en todos los estados de activación, se encuentra elevado (61). La síntesis de autoanticuerpos puede preceder el desarrollo clínico de la enfermedad. Este hallazgo es similar al observado en otras EAI (ej. diabetes, artritis reumatoide), en las cuales se puede determinar la presencia de éstos

Tabla 6. Principales autoanticuerpos en LES.

Anticuerpo	Frecuencia (%)*	Especificidad para LES**	Subgrupo clínico
dsDNA	60-90	++	Nefritis
ssDNA	90	-	
Histonas	50-70	+	
H2A,H2B		+	Lupus inducido por medicamentos
Ro (SS-A)	20-60	+	Lupus cutáneo subagudo, bloqueo cardiaco congénito
La (SS-B)	15-40	+	
Sm	10-30	++	Nefritis?, SNC?
RNP	10-30	+	Enfermedad mixta del tejido conectivo†
U1 RNP	10	+	
P-ribosomal	10-15	++	Psicosis lúpica
28 S RNA	8-12	++	
Ku/Ki	10	+	
Cardiolipinas	10-30	-	Trombosis, pérdida fetal, trombocitopenia

* La frecuencia más alta depende de la sensibilidad de la prueba utilizada para detectar los anticuerpos. Éstas se observan por lo general con técnicas de ELISA o radioinmunoensayo. En el caso de los anticuerpos anti-Sm, la frecuencia más alta se observa en pacientes negros.
** ++: Alta especificidad; +: anticuerpo presente en otra enfermedad autoinmune; -: anticuerpo presente en otra enfermedad inflamatoria.
† Síndrome de sobreposición de LES, polimiositis, y escleroderma que ocurre en mayor proporción en pacientes con anti-RNP.
DNA: ácido desoxirribonucleico; ds: doble cadena; ss: cadena sencilla; RNP: ribonucleoproteínas; RNA: ácido ribonucléico; SNC: sistema nervioso central.
Adaptado de ref. 58.

durante un largo período de tiempo antes de la primera manifestación clínica (anticuerpos predictores). En un estudio reciente, el 88% de los pacientes que presentaron LES tenían al menos un autoanticuerpo positivo antes del diagnóstico (en promedio 3.3 años) (62). Esto indica que las EAI tienen una evolución desde la respuesta inmune normal (autoinmunidad) hacia autoinmunidad patológica (EAI) influenciada por la genética y el medio ambiente (Figura 3). Las células B en los pacientes con LES tienen, además, mayores concentraciones de calcio intracitoplasmático comparadas con los controles (63). También existe evidencia que estas células son más sensibles a los efectos estimulatorios de citoquinas como IL-6 (64). De esta forma, las células B en los pacientes con LES son más susceptibles a la activación policlonal por antígenos, citoquinas y otros estímulos.

En el LES se han detectado diversas anormalidades en los linfocitos T. Aunque su número total en sangre periférica puede estar disminuido, probablemente debido a la presencia de anticuerpos antilinfocitos (65), se sabe que juegan un papel importante en en interacción con los linfocitos B lo que induce a estos últimos a producir autoanticuerpos (66). Sin embargo, la activación celular T es defectuosa en pacientes con LES (67,68), y su capacidad para proliferar en respuesta a un estímulo mitogénico y para producir IL-2 se encuentra reducida (69-72). Las razones que explican el defecto de la respuesta Th1 son especulativas, entre éstas están un defecto en la interacción entre CPA y células T, efectos supresores de los linfocitos T CD8+ y las células NK, la presencia de inhibidores de IL-2, una baja regulación de los receptores de IL-2 y disminución de linfocitos T reguladores (Treg) CD4+ CD25+ (73-75).

Citoquinas en LES

El papel de las citoquinas en LES se resume en la Tabla 7. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes con LES proliferan menos que las células de los controles cuando son estimuladas con varios mitógenos (69). Estas células producen menores cantidades de IL-2. Las células T de pacientes con LES responden menos a la estimulación por IL-2 que las célu-

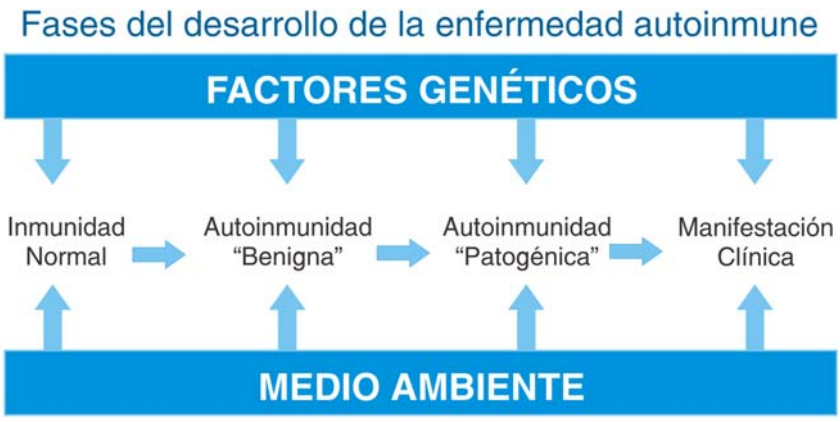


Figura 3.
Fases en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.
La respuesta autoinmune fisiológica progresa hacia una autoinmunidad patogénica (enfermedad) influenciada por la genética y el ambiente.

TABLA 7. Principales alteraciones de las citoquinas en pacientes con LES.

IL-2	Aumento en la expresión en PBMCs Aumento en la expresión del mRNA en linfocitos Aumento en la expresión del receptor soluble Disminución en la producción a estímulos antigénicos y mitogénicos en las células T
IL-6	Aumento en la expresión del mRNA en PBMCs Aumento en la producción en cultivos de sangre completa Aumento en las concentraciones séricas
IL-10	Aumento en la producción espontánea en PBMCs Aumento en el radio de células secretoras de IL-10:IFNγ en PBMCs Aumento en la expresión del mRNA en PBMCs Aumento en las concentraciones séricas de IL-10 que se correlacionan con actividad de la enfermedad
IL-12	Disminución en la producción de IL-12 por PBMCs estimulados La suplementación con IL-12 inhibe la producción de inmunoglobulinas y anticuerpos anti-DNA por PBMCs La IL-12 inhibe la acción de la IL-10 en PBMCs
TNF-α	Papel protector en lupus murino y posiblemente en el humano. Administración de anti-TNF en murinos puede predisponer al desarrollo de LES Niveles aumentados en pacientes con LES
Otras citoquinas	Aumento en las concentraciones de IL-15, IL-16 e IL-18 Aumento en la expresión del mRNA del IFNγ en PBMCs Aumento en las concentraciones séricas de IFNγ

IFN: Interferon; IL: interleuquina; PBMC: monocitos de sangre periférica; mRNA: acido ribonucleico mensajero; LES: lupus eritematoso sistémico; TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa. Adaptado de ref. 94.

las T de individuos sanos (69-71). Sin embargo, la expresión de IL-2 en preparados frescos de PBMC se halló incrementada con relación a los controles (76). La disminución de la producción *in vitro* de las células T es el resultado de muchos factores, entre ellos los efectos contrarreguladores de las citoquinas Th2. El descubrimiento de la importancia de la IL-10 en la patogénesis del LES sustenta esta hipótesis. La producción espontánea de IL-10 en linfocitos B y macrófagos de sangre periférica de pacientes con LES es mucho más alta que en los controles (77,78). La expresión de los transcriptos de IL-10 está muy aumentada en la población celular no-T de las PBMC de los pacientes con LES comparada con los controles (79,80). Además, las concentraciones séricas de IL-10 son más altas en pacientes con LES que en controles y están correlacionadas con la actividad de la enfermedad clínica y con los títulos de anti-DNA (81-83). Un incremento en la relación de células secretoras de IL-10 sobre la secreción de interferón (IFN γ) en las PBMC de los pacientes con LES se correlaciona con actividad de la enfermedad (84, 85). Finalmente, el aumento en la producción de IL-10 puede ser una causa de la respuesta Th1 defectuosa (86, 87).

Otra citoquina importante es la IL-12. Esta es una citoquina heterodimérica producida por los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas, que tiene como función promover la respuesta inmune mediada por células, al mismo tiempo que ejerce funciones inhibitorias en la respuesta humoral (88). La producción de IL-12 se ha encontrado disminuida en las PBMC de los pacientes con LES comparados con los controles (89,90). Este defecto en la producción, quizás sea debido a alteraciones en los macrófagos más no en las células B (91). En contraste, la adición de IL-12 en las PBMC de los pacientes con LES inhibe significativamente la producción de inmunoglobulinas y anticuerpos anti-DNA (92). Algunos estudios, no obstante, han observado niveles altos de IL-12 asociados con la actividad de la enfermedad (93).

El TNF-α ha demostrado reducir la actividad del LES en ratones (93). En pacientes hemos observado niveles altos de esta citoquina, en particular en aquellos con enfermedad inactiva, sugiriendo un papel protector (94) (Tabla 7).

Trastornos en la regulación inmune

La depuración de los complejos inmunes por las células fagocíticas es un mecanismo que se encuentra alterado en los pacientes con LES (45). La fagocitosis de IgG2 e IgG3 disminuida puede explicarse por alteraciones en los receptores para inmunoglobulinas (FcγR), cuyo polimorfismo genético ha sido asociado a la enfermedad (45,46). También se ha determinado que la fagocitosis no-inflamatoria de células apoptóticas está disminuida (95). La persistencia de estos cuerpos apoptóticos podría servir como inmunógenos para la inducción de linfocitos autorreactivos y como antígenos para la formación de complejos inmunes. Por otra parte, la supresión de la actividad de las células B por parte de los linfocitos T CD8+ supresores y las células NK está alterada (66, 96). Esta supresión disminuida puede ser un factor que facilite la perpetuación de la enfermedad. La Tabla 8 resume estos y otros trastornos de la regulación inmune en el LES.

Apoptosis

Defectos en la apoptosis pueden llevar a una mayor sobrevida de los linfocitos patogénicos. Esta hipótesis ha sido demostrada en modelos murinos de LES. El ratón MRL/lpr, portador del gen *lpr*, asociado con un defecto de los receptores Fas (CD95), desarrolla una EAI similar al LES humano. Esta molécula Fas cuando interactúa con su ligando (FasL) traduce señales de apoptosis (97). Dado que esta interacción se encuentra defectuosa, los ratones

Tabla 8. Trastornos del sistema inmune y de la inmunorregulación en pacientes con LES.

Hiperactividad de las células B	
	El número de células B productoras de anticuerpos en sangre periférica está aumentado
	Las anormalidades en las células B están presentes en familiares no afectados y pueden preceder el desarrollo del LES
	Las células B en LES son más propensas a una activación policlonal por antígenos específicos
	La respuesta a las señales de activación de las células B son anormales
	Los niveles incrementados de IL-6 e IL-10 pueden promover la hiperactividad de las células B
Hiperactividad de las células T	
	El número de células T activadas está incrementado en sangre periférica
	Los eventos tempranos de la activación de las células T son anormales
	La función de células T se transforma en ayudadora a células B y en la producción de inmunoglobulinas
	Las células T producen poca IL-2 en la estimulación
Función fagocítica	
	Las células fagocíticas no pueden procesar o fijar los complejos inmunes eficientemente anormal
	La fagocitosis de las células apoptóticas está disminuida
Inmunorregulación anormal	
	Defectos en la proliferación de los complejos inmunes y cuerpos apoptóticos debido a defectos tanto cuantitativos y cualitativos de proteínas del complemento (C2, C4, C1q), Fcγ, CR1, y receptores C1q en la superficie celular.
	La actividad supresora de las células T supresoras y NK sobre las células T y B activadas es inadecuada.
	El control idiotípico de la producción de anticuerpos está disrregulado.

LES: lupus eritematoso sistémico; NK: natural killer; IL: interleuquina.

presentan una linfoproliferación importante que compromete, entre otros órganos, los riñones (glomerulonefritis) (98). Otro tipo de modelo, el ratón Gld/gld, caracterizado por presentar una molécula FasL no funcional, presenta también linfoproliferación, hipergammaglobulinemia y depósito de complejos inmunes en el riñón (99). Ambos modelos, aunque utilizados para el estudio de la enfermedad, difieren del modelo humano, en el que se observa linfopenia en vez de linfoproliferación y la expresión de Fas-FasL es normal (100, 101).

El papel de la apoptosis en el LES parece deberse más a alteraciones en la depuración de células apoptóticas por parte de los macrófagos, la cual se encuentra disminuida (102). Las razones que explican esta alteración no son claras, pero pueden estar asociadas a defectos cualitativos y cuantitativos de proteínas del complemento como C2, C4 y C1q. Los pacientes con deficiencias homocigóticas de estos componentes padecen un lupus severo a una edad temprana (103). La disminución de la depuración de las células apoptóticas favorecería una mayor exposición de antígenos al sistema inmune (104-106).

Alteraciones en el sistema del complemento

Individuos con alteraciones en la vía clásica del complemento (C4, C1q) tienen mayor riesgo de presentar LES. En la práctica clínica, niveles bajos del complemento indican actividad de la enfermedad, en particular en el riñón (107). Dos hipótesis se han propuesto para explicar el desarrollo de LES en personas con deficiencias del complemento. La primera de ellas, ya señalada, es la "hipótesis de depuración" que plantea que una inadecuada depuración de cuerpos apoptóticos genera una inapropiada activación de células T y B autorreactivas. La segunda hipótesis, llamada "hipótesis de tolerancia", plantea que los componentes de la inmunidad innata son importantes en la selección negativa de los linfocitos autorreactivos, principalmente de las células B específicas para autoantígenos. Los componentes C1q y C4 aumentan la presentación de antígenos a células B inmaduras en la médula ósea. Cuando estas células B inmaduras encuentran un antígeno en estas circunstancias son seleccionadas negativamente. Así se disminuye el proceso de maduración y activación de células B autorreactivas (108).

Inmunoendocrinología

El LES es una enfermedad que afecta sobretodo a las mujeres (19). El comienzo de la enfermedad antes de la pubertad y luego de la menopausia es poco común (109). La predilección femenina es menor en los extremos de la vida (relación mujer: hombre 2:1). Los hombres con síndrome de Klinefelter, una condición asociada con hipoandrogenismo, son más propensos a padecer LES (110). Todas estas observaciones sugieren la importancia de las hormonas sexuales en la predisposición a esta enfermedad.

Una excesiva actividad estrogénica y una inadecuada actividad hormonal androgénica, tanto en los hombres como en las mujeres, pueden participar en la alteración de la respuesta inmune. Los estrógenos influyen en la proliferación celular B y producción de anticuerpos (111-113). Las altas concentraciones de estrógenos, tienen la capacidad de inhibir la respuesta celular T, como la proliferación y la producción de IL-2 (114), alteraciones éstas que se presentan en los pacientes con LES.

El efecto de los andrógenos ha sido menos estudiado. La testosterona ha mostrado reducción en la producción de inmunoglobulinas tanto en pacientes con LES como en individuos sanos (115). La dehidroepiandrosterona (DHEA) se ha asociado con aumento de la respuesta inmune Th1 y disminución de la respuesta Th2, tanto en

Tabla 9. Papel de las hormonas en el LES.

Susceptibilidad para desarrollar LES	Bajas concentraciones de estrógenos endógenos son protectoras. Bajos niveles de andrógenos en hombres incrementan el riesgo El uso de estrógenos exógenos aumenta el riesgo en mujeres
Perfil hormonal y eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en LES	Incremento en el metabolismo de estrógenos a metabolitos más potentes (ambos sexos) Bajos niveles de andrógenos (ambos sexos). Los niveles de andrógenos se correlacionan inversamente con la actividad de la enfermedad en mujeres. Las concentraciones de prolactina se correlacionan con actividad de la enfermedad. Evidencia preliminar de defectos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal en mujeres no tratadas con LES.
Hormonas, actividad y pronóstico	La actividad de la enfermedad tiende a reducir en la menopausia. Las exacerbaciones del LES pueden ocurrir durante periodos de rápidos cambios hormonales. Fluctuación cíclica de la actividad de la enfermedad en mujeres durante el ciclo menstrual Las pacientes con LES de comienzo post-menopaúsico tienen más baja actividad y mejor pronóstico de la patología.

humanos como en ratones (116-117). La concentración de estrógenos endógenos puede influir en la actividad y curso de la enfermedad. De hecho, las exacerbaciones de la enfermedad pueden presentarse en períodos de rápidos cambios hormonales, como el embarazo y el puerperio (118). Además, la actividad del LES tiende a disminuir durante la menopausia (119).

Otra hormona con características inmunomoduladoras es la prolactina, la cual es capaz de acelerar el proceso autoinmune en ratones susceptibles al LES (120) y sus niveles se han correlacionado con la actividad de la enfermedad en humanos (ver Capítulo 14).

De esta manera, existe clara evidencia que las hormonas son notables en la fisiopatología del LES (Tabla 9). Al mismo tiempo que se conocen estos hallazgos, diferentes terapias dirigidas a regular las hormonas están siendo investigadas para el manejo de la enfermedad.

Medio ambiente

Como se discutió previamente, el desarrollo del LES quizás sea disparado por factores ambientales, en personas genéticamente susceptibles. Múltiples agentes ambientales han sido implicados, desde infecciones hasta sustancias tóxicas y medicamentos (Tabla 10). La asociación entre algunos fármacos y LES (lupus inducido por medicamentos) es bien conocida y se analiza más adelante.

Factores físicos /químicos

El uso crónico de tintes para el cabello fue sugerido como posible factor ambiental asociado con la enfermedad (121); pero esta observación no ha sido confirmada (122,123). Un estudio reciente reportó una débil asociación entre tabaquismo y LES (124). La exposición a la luz solar es un factor ambiental bien conocido tanto en la inducción como en la exacerbación del lupus cutáneo y el LES. La luz ultravioleta, especialmente la B, se asocia con estas manifestaciones pues altera la localización y/o química del DNA, y probablemente aumente su inmunogenicidad (125) (ver Capítulo 29). Se sabe además que la luz solar induce apoptosis de queratinocitos, proporcionando un mecanismo mayor de exposición a autoantígenos (126).

Factores nutricionales y agentes infecciosos

Aunque varios de estos factores se han sugerido como factores implicados en la patogénesis del LES, ninguno ha sido demostrado. La ingestión de alfalfa ha sido asociada con el desarrollo de LES en varios reportes de casos (127). Algunos virus se han implicado como factores disparadores, o exacerbadores, debido a su potencial de activar células B, o liberar autoantígenos luego del daño tisular que causan. Sin embargo, la evidencia que apoya un origen infeccioso del LES es débil (128).

Estrógenos

El uso de terapia de reemplazo hormonal y píldoras anticonceptivas se ha asociado con un pequeño incremento en el riesgo de desarrollar LES (129, 130). De esta manera, los estrógenos exógenos podrían ser desencadenantes del proceso autoinmune en individuos susceptibles.

Patología

Los principales hallazgos incluyen inflamación y anormalidades de los vasos sanguíneos, que corresponden a vascu-

Tabla 10. Factores ambientales que pueden ser relevantes en la patogénesis del LES.

Factores físico/químicos
Aminas aromáticas
Hidracinas
Fármacos (procainamida, hidralazina, clopromazina, isoniazida, fenitoína, penicilamina)
Tabaquismo
Tinturas de cabello
Luz ultravioleta
Factores dietéticos
L-canavanina (alfalfa)
Alta ingesta de grasa saturada
Agentes infecciosos
DNA bacteriano/endotoxinas?
Retrovirus?
Hormonas
Terapia de reemplazo hormonal y píldoras anticonceptivas
Exposición prenatal a estrógenos?

lopatía oclusiva, vasculitis y depósito de complejos inmunes. Uno de los órganos más estudiados ha sido el riñón, en donde, característicamente se observa inflamación, proliferación celular, anormalidades en la membrana basal y depósitos de complejos inmunes. Éstos pueden estar en el mesangio o en superficies subepiteliales y subendoteliales. Otros órganos o sistemas afectados por el LES muestran anormalidades vasculares e inflamatorias no específicas. Un ejemplo es la presencia de microinfartos corticales y vasculopatía con degeneración o cambios proliferativos en pacientes con compromiso del sistema nervioso central. La presencia de vasculitis necrotizante es escasa. La vasculopatía oclusiva es un hallazgo histológico común en presencia de anticuerpos antifosfolipídicos. La evidencia de ateroesclerosis y daño tisular generado por la hipertensión, los corticoesteroides y otros fármacos puede ser demostrada en pacientes que han tenido larga evolución.

Manifestaciones clínicas

El LES es una enfermedad multisistémica por excelencia, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que varían en frecuencia de aparición y severidad entre pacientes. El compromiso puede ir desde condiciones tan severeas que ponen en riesgo la vida como la nefritis o el compromiso neurológico, hasta trastornos menos severos que comprometen la piel o las articulaciones. De hecho, el compromiso más común es articular, encontrado en 83% de los pacientes, seguido por el compromiso hematológico en un 75% (131). Los síntomas constitucionales se registran en el 42%, mientras que el compromiso renal puede variar entre 35 y 60% de los casos (131).

Compromiso cutáneo

Se pueden encontrar hasta en un 70% de los pacientes, siendo muy heterogéneas en su presentación clínica. Estas lesiones se pueden dividir en específicas (eritema malar, lupus discoide) o no específicas de la enfermedad (vasculitis, alopecia); o en lesiones agudas, subagudas y crónicas. En las lesiones agudas se pueden encontrar el eritema malar (hasta en el 40% de los pacientes) y las úlceras orales, las cuales están incluidas en los criterios de clasificación de la enfermedad. Las lesiones del lupus cutáneo subagudo pueden dividirse en anulares y papuloescamosas, las cuales tienen por lo general una distribución simétrica en hombros, cuello y espalda, y son lesiones fotosensibles. También se asocian con la presencia de anticuerpos anti-Ro y HLA-DR3. Estas lesiones por lo general no dejan cicatriz. El lupus discoide, que también se considera dentro de los criterios de clasificación, corresponde a lesiones hiperqueratósicas, acompañadas con taponamiento folicular, presentes en el cuero cabelludo y piel de la cara, crónicas y cicatriciales (ver Capítulo 29).

Musculoesqueléticas

Cerca del 80% de los pacientes padece de algún compromiso músculoesquelético. La artritis lúpica puede simular una artritis reumatoide en su fase inicial sin embargo rara vez causa erosiones óseas y deformidades. Una forma particular de deformidades por compromiso del tejido de soporte de las estructuras articulares es conocida también como artropatía de Jaccoud y ocurre entre el 5%-10%. La cuarta parte de los pacientes se presenta con mialgias, pero al mismo tiempo pueden tener una miopatía proximal no dolorosa semejante a la encontrada en pacientes con polimiositis, en cuyo caso se debe diferenciar de aquella producida por medicamentos como los antimaláricos y los esteroides. Otros síntomas osteomusculares son causados por la presencia de una fibromialgia (20% de los casos) y necrosis avascular, más en la cabeza femoral y humeral, secundaria a la enfermedad de base o al manejo con corticoesteroides.

Cardiopulmonares

Cualquier túnica cardíaca puede verse afectada, pudiéndose observar pericarditis, miocarditis, endocarditis, enfermedad valvular, arritmias, lesiones ateromatosas, etc; todas causantes de una importante morbimortalidad. Estas manifestaciones se pueden presentar hasta en la tercera parte de los pacientes, siendo la pericarditis la manifestación más frecuente y menos severa. La miocarditis es difícil de diagnosticar y se presenta la mayoría de las veces asintomática. La lesión más característica es la presencia de endocarditis verrugosa atípica o de Libman-Sacks, la cual se observa con mayor proporción en las válvulas mitrales y aórticas. Esta lesión se asocia con la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos. También hay ateroesclerosis prematura, asociada a la enfermedad y a los tratamientos con corticoesteroides. El compromiso cardíaco puede evidenciarse por ecocardiografía hasta en un 57% de los pacientes (132).

Las manifestaciones pulmonares incluyen pleuritis y derrame pleural, que ocurren hasta en un 40% de los pacientes; compromiso pulmonar agudo secundario a infecciones, falla cardíaca o medicamentos; neumonitis y hemorragia pulmonar. Estas dos últimas son complicaciones graves. La prevalencia de enfermedad pulmonar intersticial en los pacientes con LES es inferior a la de otras patologías autoinmunes como esclerodermia, reportada en menos del 3% de los casos (133).

Renales

En población latinoamericana la nefritis lúpica se observa en aproximadamente la mitad de los pacientes con LES, diferente a las poblaciones europeas, donde su porcentaje es menor (30%). Sin embargo, puede observarse nefritis silenciosa, principalmente mesangial, en pacientes con LES sin evidencia clínica de compromiso renal (134). La nefritis tiende a presentarse principalmente durante los primeros dos años de la enfermedad (135). Puede ser la primera manifestación del LES en un 5% de los casos. En la Tabla 11 se resume la clasificación actual de la nefritis lúpica (136). Es característica su variabilidad histológica entre pacientes, entre biopsias y aún entre glomérulos. Las recaídas de las manifestaciones renales

Tabla 11. Clasificación de la nefritis lúpica.

Clase I	Nefritis lúpica minima mesangial
Clase II	Nefritis lúpica proliferativa mesangial
Clase III	Nefritis lúpica focal
Clase IV	Nefritis lúpica difusa segmentaria (IV-S) o global (IV-G).
Clase V	Nefritis lúpica membranosa
Clase VI	Nefritis lúpica esclerosante avanzada

Clasificación Abreviada de la Sociedad Internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal (ISN/RPS) para nefritis lúpica.
Definiciones:
Difusa: una lesión que involucra más del 50% de los glomérulos
Focal: una lesión que involucra menos del 50% de los glomérulos
Global: una lesión que involucra más de la mitad del penacho glomerular
Segmentaria: una lesión que involucra menos de la mitad del penacho glomerular.

Tabla 12. Principales hallazgos del laboratorio en pacientes con nefritis lúpica.

- Velocidad de sedimentación acelerada
- Anemia (Hb <11g%)
- Proteinuria >500 mg/24 horas
- Anticuerpos antinucleares positivos
- Títulos altos de anticuerpos anti-DNA
- Disminución del complemento (C3 y C4)

son una importante característica en los pacientes con LES a pesar de la terapia (137). Los hallazgos principales de laboratorio asociados con la presencia de nefritis lúpica se muestran en la Tabla 12 (138) y las indicaciones y utilidad de la biopsia renal se presentan en las Tablas 13 y 14.

Neuropsiquiátricas

Hasta un 60% de los pacientes presentan alteraciones de este tipo. Son variadas, pudiéndose observar desde una leve alteración cognoscitiva o del estado de ánimo hasta cuadros severos de psicosis o vasculitis que pueden comprometer la vida. Es difícil distinguir cuál es la causa de la alteración que se presenta, si el origen es primario de la enfermedad o secundario a otros compromisos como hipertensión arterial, infecciones, fármacos, trastornos metabólicos como uremia, o trastornos hidroelectrolíticos. Se pueden presentar manifestaciones como convulsiones, encefalopatía, depresión, psicosis, meningitis aséptica (asociada con el uso de medicamentos como azatioprina o algunos AINEs), corea, cefalea, etc. En las formas de mielitis, corea o trombosis predomina la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (139). Mejores técnicas bioquímicas y radiológicas (RMN) permiten un diagnóstico más acertado y una mejor evaluación de la enfermedad (140). Ocasionalmente, los pacientes con LES pueden padecer psicosis inducida por el uso de esteroides. Esta complicación se asocia a dosis altas e hipoalbuminemia (141).

Hematológicas

Son manifestaciones muy frecuentes. La anemia es común, presentándose en más del 50% de los pacientes. La anemia hemolítica se observa entre el 5% y el 10% de los casos; puede asociarse con trombocitopenia autoinmune (síndrome de Evans) y anticuerpos anticardiolipinas. Otras manifestaciones hematológicas frecuentes son: la presencia de linfopenia (<1000 /mm3), asociada a la actividad de la enfermedad, y neutropenia (<2500/mm3). Además de los defectos cuantitativos de los leucocitos, hay alteraciones funcionales de los neutrófilos que explican, en parte, la susceptibilidad a las infecciones que se presentan en los pacientes con LES. La trombocitopenia ocurre entre el 25% y 50% de los pacientes, pero en menos del 10% de los casos es severa (<50.000/mm3). Otro hallazgo importante es la presencia, en cerca de la mitad de los pacientes, de anticuerpos contra componentes de la cascada de la coagulación. De ellos, el anticoagulante lúpico se presenta hasta en un 30% de los pacientes, pero sólo en pocos de ellos se asocia con manifestaciones trombóticas. Los anticuerpos anticardiolipinas se pueden encontrar entre el 30% y 40% de los pacientes. El síndrome antifosfolipídico se revisa en el Capítulo 23. La presencia de crioglobulinas se documentó en el 25% de 122 pacientes con LES, en quienes era más común la presentación de

Tabla 14. Utilidad de la biopsia renal en pacientes con LES.

- Establecer el tipo de glomerulonefritis (OMS, NTI, ERV)
- Guíar el tratamiento
  - Tipo de glomerulonefritis
  - Índices de actividad y cronicidad
- Determinar el pronóstico

LES: Lupus eritematoso sistémico, OMS: organización mundial de la salud, NTI: nefritis tubulointersticial, ERV: enfermedad renal vascular.
Tomado de ref. 138.

Tabla 13. Indicación de biopsia renal en pacientes con LES.

Pacientes con diagnóstico de LES y sospecha de nefropatía (frecuente)	
	Proteinuria (>500 mg/24h) Sedimento urinario anormal Creatinina aumentada Deterioro de la función renal (incremento en nitrogenados o disminución en la filtración glomerular.)
Pacientes con nefritis y sospecha no confirmada de LES (raro)	
¿A quiénes repetir la biopsia?	
	No respuesta al tratamiento (evaluado luego de 6 meses) Cambios en la presentación clínica (sugestivo de trasformación histológica) Recaídas o manifestaciones tardías (diferenciar nefropatía activa vs. cicatricial)

Tomado de ref. 138.

vasculitis cutánea comparados con los pacientes con LES sin crioglobulinas (142). La velocidad de sedimentación globular se halla acelerada en los periodos de actividad, a diferencia de los niveles de proteína C reactiva (PCR), cuya respuesta como reactante de fase aguda es defectuosa en los pacientes con enfermedad activa. Sin embargo, su incremento puede facilitar el diagnóstico diferencial cuando existe una infección concomitante con una reactivación de la enfermedad. El gen de la PCR es un candidato de susceptibilidad para la enfermedad (38). Su polimorfismo es funcional (ver Capítulo 19).

Gastrointestinales

El tracto gastrointestinal se puede afectar en toda su extensión, desde la boca hasta el colon. En conjunto, hasta el 50% de los pacientes tienen alguna manifestación gastrointestinal durante el curso de su enfermedad. Las más comunes son las úlceras orales, náuseas, vómito, y dolor abdominal. Se pueden observar alteraciones funcionales, como la presencia de un síndrome de intestino irritable, en cerca del 20% de los pacientes, asociado generalmente, con fibromialgia. Otras manifestaciones menos frecuentes, pero no menos importantes, son la enteropatía perdedora de proteínas, la pseudoobstrucción intestinal crónica, la pancreatitis y la hepatitis lúpica.

Lupus neonatal

El lupus neonatal es una patología autoinmune desencadenada por el paso transplacentario de autoanticuerpos en la circulación fetal entre las semanas 18 y 24 de gestación. Se asocia fuertemente con la presencia de anticuerpos maternos anti-Ro y anti-La, independiente de la patología de base que padezca la madre (LES, Síndrome de Sjögren o incluso madres totalmente asintomáticas). La principal manifestación y la más temida es el bloqueo cardíaco congénito, debido a la injuria causada por los autoanticuerpos. Un 60% de estos niños requieren como manejo un marcapasos y cerca de la tercera parte mueren. Otras manifestaciones asociadas con el lupus neonatal son manifestaciones cutáneas, colestasis y citopenias. Estas manifestaciones no-cardíacas son transitorias y se resuelven aproximadamente a los 6 meses de vida, coincidiendo con el tiempo de desaparición de los autoanticuerpos maternos de la circulación neonatal.

Lupus inducido por medicamentos

El lupus inducido por medicamentos es una entidad que es aún poco entendida. Esta asociación representa el más claro ejemplo de un agente ambiental como disparador de EAI. Aproximadamente 100 fármacos diferentes se han asociado con el desarrollo de lupus, y de forma importante, algunas de las nuevas terapias utilizadas en el tratamiento de la artritis reumatoide, como los bloquedores del TNFα, parecen estar asociadas con una mayor presentación de este tipo de lupus (143). Para el diagnóstico de esta entidad es importante esclarecer que las manifestaciones y el perfil de autoanticuerpos se presenta luego de la exposición al medicamento y que se resuelven una vez se suspende el fármaco. Los anticuerpos en este tipo de lupus reaccionan contra histonas o complejos de DNA-histonas. En la Tabla 15 se resumen los principales medicamentos implicados en el desarrollo de lupus.

Tabla 15. Fármacos implicados con buena evidencia en el desarrollo de lupus inducido por medicamentos.

Carbamazepina	Clorpromazina
Etosuximida	Fenitoína
Hidralazina	Isoniazida
Metildopa	Minociclina
Penicilamina	Procainamida
Anti-TNF	Sulfasalazina

Actividad de la enfermedad

Ésta debe ser evaluada con el fin de detectar exacerbaciones, diferenciarla de infecciones y tomar conductas orientadas según sea el caso. La actividad de la enfermedad debe diferenciarse del daño crónico producido por el LES. Tanto los parámetros que sugieren actividad clínica y de laboratorio pueden agruparse en el índice SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Activity Index). Este índice consiste en evaluar 24 parámetros y de acuerdo a su presencia o no, se asigna un puntaje según el grado de severidad. El puntaje máximo es 105, pero en realidad es poco común que estos puntajes sean mayores de 30. Se considera que puntajes inferiores a 3 indican enfermedad no activa o controlada, puntajes entre 3 y 12 indican enfermedad activa, y puntajes superiores a 12 indican enfermedad muy activa. Un cambio superior a 3 en el seguimiento de los pacientes indica actividad con respecto al control anterior. En la Tabla 16 se muestran los parámetros incluidos en el SLEDAI y sus respectivos puntajes (144). Nuevos marcadores de actividad de la enfermedad están siendo evaluados, entre ellos los niveles de algunas citoquinas (85,145-147).

Lupus severo

El LES severo es definido cuando se manifiestan aspectos relacionados con la enfermedad que incrementan de forma importante la morbimortalidad (148) o alteran de forma importante la función de órganos no vitales (vasculitis retiniana). Las formas de presentación más comunes incluyen la nefritis, vasculitis cutánea, miocardiopatía, vasculitis pulmonar, trombocitopenia autoinmune y vasculitis del sistema nervioso central. En la Tabla 17 se resumen las principales formas clínicas de lupus severo. El manejo incluye altas dosis de esteroides (a dosis de 1 mg/kg/día), al menos por 6 semanas y otras terapias inmunosupresoras. El LES es la EAI más frecuentemente observada en unidades de terapia intensiva (UTI). La actividad de la enfermedad y la infección son las principales causas de admisión a la UTI. Pacientes con LES que requieren manejo en UTI deben ser particularmente evaluados en función del daño orgánico (APACHE II, ODIN) (149).

Tabla 16. Índice de actividad del lupus eritematoso sistémico (SLEDAI).

Convulsiones	8
Psicosis	8
Síndrome mental orgánico	8
Alteraciones visuales	8
Nervios craneanos	8
Cefalea lúpica	8
Accidente cerebrovascular	8
Vasculitis	8
Artritis	4
Miositis	4
Cilindros urinarios	4
Hematuria	4
Proteinuria	4
Piuria	4
Eritena malar	2
Alopecia	2
Úlceras orales	2
Pleuresía	2
Pericarditis	2
Disminución del complemento	2
Incremento en niveles de DNA	2
Fiebre	1
Trombocitopenia	1
Leucopenia	1

Un índice mayor de 3 indica actividad de la enfermedad. Si este resultado es mayor de 12 indica una enfermedad muy activa. Tomado de ref. 144.

Tabla 17. Formas clínicas de LES severo.

Manifestaciones que amenazan la vida (mortalidad mayor del 10% en 3 meses)
Miocarditis
Arteritis coronaria
Pancreatitis
Vasculitis mesentérica
Gangrena digital
Anemia aplásica
Hemorragia pulmonar
Embolia pulmonar
Vasculitis del SNC
Anemia hemolítica
Taponamiento pericárdico
Síndrome de Budd-Chiari
Púrpura trombocitopénica trombótica
Hipertensión pulmonar
Lupus severo con compromiso en órganos vitales
Endocarditis de Libman-Sacks
Hiperviscocidad
Esclerosis lupoide
Enteropatía perdedora de proteínas
Neuritis óptica
Síndrome antifosfolipídico
Hepatitis lúpica
Crioglobulinemia
Mononeuritis múltiple
Leucopenia
Vestibulitis
Cirrosis biliar
Enfermedad pulmonar intersticial
Pseudotumor cerebri
Vasculitis cutánea
Nefritis proliferativa

Embarazo y LES

El embarazo plantea ciertos puntos importantes en el comportamiento del LES. Una exacerbación en los síntomas de la enfermedad se puede presentar debido al incremento en la producción de estrógenos y prolactina. También se incrementa la morbilidad fetal, nacimientos pretérmino, mayor incidencia de preeclampsia, y ruptura prematura de membranas ovulares, entre otras complicaciones obstétricas. Estas pacientes deben recibir un monitoreo continuo durante su embarazo, con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-Ro o anti-La que aumenten el riesgo para lupus neonatal. Los anticuerpos antifosfolipídicos están asociados con un riesgo importante de morbimortalidad fetal, con el incremento de pérdidas fetales, retardo en el crecimiento y aumento de preeclampsia. Sin embargo, el pronóstico en este tipo de pacientes ha mejorado con un seguimiento oportuno y con tratamientos efectivos y seguros (150).

Tratamiento

Su objetivo es el control del proceso autoinmune. Debe realizarse de acuerdo al compromiso predominante. El tratamiento se puede dividir en manejo no-farmacológico y farmacológico. Dentro del primero se resalta evitar la exposición a la luz solar y el uso de protectores solares en pacientes con compromiso cutáneo. Las píldoras anticonceptivas con altas dosis deben evitarse. El uso de terapia de reemplazo hormonal es aún controversial, pero en el futuro investigaciones sobre el uso de estrógenos en los pacientes con LES proveerá respuestas sobre este aspecto. Otro aspecto no-farmacológico importante es la disminución de factores de riesgo cardiovascular como el tabaquismo, dada la alta incidencia de muerte prematura de pacientes con LES debido a la ateroesclerosis acelerada (151), la cual es independiente de los otros factores de riesgo tradicionales de enfermedad cardiovascular (152).

El manejo farmacológico de los pacientes con LES se puede dividir en cuatro grupos: los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), esteroides, antimaláricos y agentes citotóxicos. En las Tablas 18 y 19 se presentan las principales indicaciones y efectos adversos de estos fármacos.

Otras terapias usadas en grupos seleccionados de pacientes son la plasmaféresis, gammaglobulinas intravenosas, ciclosporina, micofenolato mofetil, depleción linfocitaria B con anticuerpos monoclonales (ej. rituximab -ver Capítulo 34), y trasplante de células madre hematopoyéticas (Capítulo 38) (153,154).

Nefritis lúpica

El tratamiento de la nefritis lúpica (Clase III-IV) se ha basado en un esquema terapéutico mensual con ciclofosfamida por 6 meses, y luego un bolo trimestral hasta com-

Tabla 18. Indicaciones en el manejo de pacientes con LES.

	AINEs	Antimaláricos	Corticoesteroides	Citotóxicos
Malestar general	-	+	+	-
Fiebre	+	-	+	-
Serositis	+	-	+	-
Artralgias	+	+	+	-
Artritis	+	+	+	+
Mialgias	+	+	+	-
Miositis	-	-	+	+
Eritema malar/discoide	-	+	+	-
Neumonitis	-	-	+	+
Carditis	-	-	+	+
Vasculitis	-	-	+	+
Compromiso neurológico	-	-	?*	?
Renal	-	-	+	+
Anemia hemolítica	-	-	+	+
Trombocitopenia	-	-	+	+
Fenómeno de Raynaud	-	-	?	?
Alopecia	-	-	?	?

+: Usualmente benéfico, -: no benéfico; ?: dudoso; ?*: ampliamente utilizado pero la evidencia no lo sustenta. SNC: Sistema nervioso central. Adaptado de ref. 153.

pletar dos años, sumado a dosis altas de corticoesteroides (0.5 a 1 mg/kg/día) (155-157). No obstante, estudios recientes han mostrado que protocolos menos agresivos pueden ser tan efectivos en este tipo de pacientes. Así, una terapia con ciclofosfamida intravenosa por corto tiempo, seguido de una terapia de mantenimiento con micofenolato mofetilo o azatioprina, parece ser eficaz y más segura que la terapia inicialmente mencionada (158,159). Además, dosis más bajas de ciclofosfamida seguida por azatioprina han mostrado resultados clínicos comparables con aquellos obtenidos con dosis altas (160). Otros tratamientos como inmunoglobulinas intravenosas (161) o Rituximab pueden ser usados en circunstancias especiales o en pacientes resistentes al tratamiento (162).

Tabla 19. Efectos adversos más comunes de los medicamentos usados en LES.

Fármaco	Efectos adversos
AINEs	Sangrado gastrointestinal
Antimaláricos	Retinopatía
Corticosteroides	Osteoporosis Hipertensión Intolerancia a la glucosa Hirsutismo Riesgo de infección
Azatioprina	Toxicidad en médula ósea Disfunción hepática
Ciclofosfamida	Toxicidad en médula ósea Cistitis hemorrágica Incremento en el riesgo de malignidad Infertilidad /amenorrea Nauseas / vómito

Pronóstico

La sobrevivencia en los pacientes con LES ha mejorado dramáticamente en los últimos 50 años. En el año de 1955, la tasa de sobrevivencia a los 5 años de los pacientes con LES era tan solo del 50% (163), mientras que en la década del 90, estos valores excedieron el 90%, y a los 20 años es superior al 70% (164,165). Algunos factores que contribuyen en este aspecto son un diagnóstico más temprano, mejor tratamiento de la enfermedad y de sus complicaciones (diálisis y trasplante renal). Sin embargo, a pesar de lo anterior, la mortalidad en pacientes con LES es entre 3 y 6 veces mayor que en la población general (165, 166). Cuando la mortalidad ocurre tempranamente se debe a la actividad de la enfermedad, sobretodo a nivel renal y sistema nervioso central; y cuando ocurre tardíamente se debe a las complicaciones de la enfermedad misma o derivadas del tratamiento. Los valores de creatinina y la proteinuria son predictores importantes de mortalidad en el LES (167,168).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología, y Colciencias, Bogotá, Colombia.

Referencias

1. Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. Science 1990; 248: 1380-8
2. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. Clin Immunol Immunopathol 1997; 84: 223-43
3. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. N Engl J Med 2001; 345: 340-350
4. Kammer GM, Mishra N. Systemic lupus erythematosus in the elderly. Rheum Dis Clin N Am 2000; 26: 475-92
5. Font J, Cervera R, Espinosa G, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. Ann Rheum Dis 1998; 57: 456-9
6. Domenech I, Aydintug O, Cervera R, et al. Systemic lupus erythematosus in 50 year olds. Postgrad Med J 1992; 68: 440-4
7. Jimenez S, Cervera R, Font J, Ingelmo M. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. Clin Rev Allergy Immunol 2003; 25: 3-12
8. Siegel M, Holley HL, Lee SL. Epidemiologic studies on systemic lupus erythematosus. Comparative data for New York City and Jefferson County, Alabama, 1956-1965. Arthritis Rheum 1970; 13: 802-11
9. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. Arch Int Med 1974; 134: 1027-35
10. Michet CJ, McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. Mayo Clin Proc 1985; 60: 105-13
11. Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. Arthritis Rheum 1985; 28: 80-6
12. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. Arthritis Rheum 1995;38: 1260-70
13. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1973; 3: 1-54
14. Manzi SM, Stark VE, Ramsey-Goldman R. Epidemiology and classification of systemic lupus erythematosus. En: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Editores: Rheumatology. 3ª Edición, Mosby. 2003: 1291-6
15. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus ina a geographically complete cohort of patients. Ann Rheum Dis 1994; 53: 675-80
16. Johnson AE, Gordon G, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. Arthritis Rheum 1995; 38: 551-8
17. Bae SC, Fraser P, Liang MH. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the "prevalence gradient hypothesisi". Arthritis Rheum 1998; 41: 2091-9
18. Symmons DP. Frequency of lupus in people of African origen. Lupus 1995; 4: 176-8
19. Cervera R, Khamastha MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1,000 patients. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Medicine 1999; 78: 167-75
20. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. Medicine 2003; 82: 299-308
21. Iriya SM, Capelozzi VL, Calich I, Martins MA, Lichtenstein A. Causes of death in patients with systemic lupus erythematosus in Sao Pulo, Brazil: a study of 113 autopsies. Arch Int med 2001; 161: 1557
22. Juarez M, Misischia R, Alarcon GS. Infections in systemic connective tissue diseases: systemic lupus erythematosus, scleroderma, and polymyositis/dermatomyositis. Rheum Dis Clin N Am 2003; 29: 163-84.
23. Alarcon GS, McGwin G Jr, Bastian HM, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. Predictors of early mortality in the LUMINA cohort. LUMINA Study Group. Arthritis Rheum 2001; 452: 191-202
24. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. The GLADEL Multinational Latin American porospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus. Medicine 2004; 83: 1-17
25. Bastian HM, Roseman JM, McGwin Jr G, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. Lupus 2002; 11: 152-60
26. Alarcon GS, McGwin Jr G, Petri M, Reveille JD, Ramsey-Goldman R, Kimberly RP. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. Lupus 2002; 11: 95-101
27. Alarcón GS, McGwin Jr G, Bartolucci AA, et al. Systemic lupus erythematosus in three etnic groups. IX: Differences in damage accrual. Arthritis Rheum 2001; 44: 2797-2806.
28. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271-77
29. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725
30. Priori R, Medda E, Conti F, et al. Familial autoimmunity as a risk factor for systemic lupus erythematosus and vice versa: a case-control study. Lupus 2003; 12: 735-40
31. Pitetsky DS. Systemic lupus erythematosus. A. Epidemiology, pathology and pathogenesis. In: Klippel JH, ed. Primer on the rheumatic diseases, 11th ed. Georgia, USA: Arthritis Foundation, 1997; 246-51
32. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. Immunobiology 1998; 199: 265-85
33. Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. Lupus 1995; 4: 425-37
34. Galeazzi M, Sebastiani GD, Morozzi G, et al. HLA class II DNA typing in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Correlations with clinical and autoantibody subsets. Medicine 2002; 81: 169-78
35. Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, et al. HLA-DPB1 alleles association of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2003; 12: 560-63
36. Atkinson JP. Complement activation and complement receptors in systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immunopathol 1986; 9: 179-94
37. Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. Ann Rheum Dis 2004; 63: 91-94
38. Russell AI, Cunninghame-Graham DS, Shepherd C, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet 2004; 13: 137-47
39. Magnusson V, Johanneson B, Lima G, et al. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. Genes Immun 2004: 5: 130-7
40. Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2004; 31:2163-8
41. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF-a polymorphism. J Rheumatol 2005; 32 (in press)
42. Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. Genes Immun 2004; 5: 609-14
43. Correa PA, Molina JF, Pinto LF, Arcos-Burgos M, Herrera M, Anaya JM. TAP1 and TAP2 polymorphisms analysis in northwestern Colombian patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2003;62: 363-5
44. Yun HR, Koh HK, Kim SS, et al. FcgammaRIIa/IIIa polymorphism and its association with clinical manifestations in Korean lupus patients. Lupus 2001; 10: 466-72
45. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factor for lupus nephritis in African Americans. J Clin Invest 1996; 97: 1348-54
46. Koene HR, Kleijer M, Swaak AJ, et al. The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 1813-18.
47. Zuñiga R, Ng S, Peterson MG, et al. Low-binding alleles of Fcgamma receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in Hispanic pacients. Arthritis Rheum 2001; 44: 361-7
48. Nath SK, Kelly JA, Harley JB, Scofield RH. Mapping the systematic lupus erythematosus susceptibility genes. Methods Mol Med 2004; 102: 11-30
49. Nath SW, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. Curr Opin Immunol 2004; 16: 794-800
50. Vlahakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. J Am Soc Nephrol 1992; 2: 1345-54
51. Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, et al. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. Kidney Int 1995; 48: 705-11

52. Hahn BH. Antibodies to DNA. N Engl J Med 1998; 338: 1359-68
53. Foster MH, Cizman B, Madaio MP. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanism of immune deposition, and genetic origins. Lab Invest 1993; 69: 494-507
54. Van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. Nephrol Dial transplant 1997; 12: 57-66
55. Burlingame RW, Cervera R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies. Autoimmun Rev 2002; 1: 321-28
56. Galeazzi M, Morozzi G, Sebastiani GD, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. Clin Exp Rheumatol 1998; 16: 541-6
57. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. Semin Arthritis Rheum 2004;34: 501-37
58. Fritzler MJ, Elkon KB. Autoantibodies in SLE. En: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Editores: Rheumatology. 3ª Edición, Mosby. 2003: 1337-46
59. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B´-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. J Exp Med 1995; 181: 453-61
60. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. Nature Immunol 2001; 2: 764-66
61. Klinman DM, Shirai A, Ishigatsubo Y, Conover J, Steinberg AD. Quantitation of IgM-and IgG-secreting B cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1991; 34: 1404-10
62. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2003; 349: 1526-33
63. Liossis SN, Kovacs B, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduccion events. J Clin Invest 1996; 98: 2549-57
64. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. J Immunol 1991; 147: 117-23
65. Bakke AC, Kirkland PA, Kitridou RC, et al. T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. Correlations with corticosteroid therapy and disease activity. Arthritis Rheum 1983; 26: 745-50
66. Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr, Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. Arthritis Rheum 1990; 33: 1216-25
67. Portales-Perez D, Gonzalez-Amaro R, Abud-Mendoza C, Sanchez-Armass S. Abnormalities in CD69 expression, cytosolic pH and Ca2+ during activation of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 1997; 6: 48-56
68. Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Morado C, Hernandez-Garcia C, Banares A, Jover JA. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998; 7:314–22
69. Horwitz DA, Garrett MA. Lymphocyte reactivity to mitogens in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and scleroderma. Clin Exp Immunol 1977; 27:92–99
70. Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1982; 69:1388–92
71. Warrington RJ. Interleukin-2 abnormalities in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. A role for overproduction of interleukin-2 in human autoimmunity? J Rheumatol 1988;15: 616–20
72. Linker-Israeli M, Bakke AC, Kitridou RC, Gendler S, Gillis S, Horwitz DA. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). J Immunol 1983;130: 2651–5
73. Garcia-Cozar FJ, Molina IJ, Cuadrado MJ, Marubayashi M, Pena J, Santamaria M. Defective B7 expression on antigen-presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Clin Exp Immunol 1996; 104:72–79
74. Lauwerys BR, Houssiau FA. Cytokines: clues to the pathogenesis of SLE. Lupus 1998; 7: 211–213
75. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Rheum 2004; 59: 198-202
76. Horwitz DA, Wang H, Gray JD. Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: increased interleukin-2 but not interleukin-4 mRNA. Lupus 1994; 3:423-8
77. Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, et al. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. Eur Cytokine Netw 1993; 4: 421–7
78. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. Arthritis Rheum 1994; 37: 1647–55
79. Csiszar A, Nagy G, Gergely P, Pozsonyi T, Pocsik E. Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 2000; 122: 464–670
80. Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13:403-12
81. Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renauld JC. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. Lupus1995; 4: 393–5
82. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol 1998; 16: 283–8
83. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol 2000; 18:565–70
84. Hagiwara E, Gourley MF, Lee S, Klinman DK. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10: interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. Arthritis Rheum 1996; 39: 379–85
85. Miret C, Font J, Molina R, et al. Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. Anticancer Res 2001; 21: 4053-9.
86. Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, Houssiau FA. Interleukin-10 blockade corrects impaired in vitro cellular immune responses of systemic lupus erythematosus patients. Arthritis Rheum 2000; 43:1976–81
87. Tyrrell-Price J, Lydyard PM, Isenberg DA. The effect of interleukin-10 and of interleukin-12 on the in vitro production of anti-double-stranded DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol 2001; 124: 118–25
88. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood 1994; 84: 4008–27.
89. Horwitz DA, Gray JD, Behrendsen SC, et al. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. Arthri Rheum 1998; 41: 838–44
90. Liu TF, Jones BM. Impaired production of IL-12 in systemic lupus erythematosus. I. Excessive production of IL-10 suppresses production of IL-12 by monocytes. Cytokine 1998; 10: 140–147
91. Liu TF, Jones BM. Impairment of IL-12 production in SLE is due to defective monocytes, not B cells. Immunol Lett 1997; 56: 314
92. Houssiau FA, Mascart-Lemone F, Stevens M, et al. IL-12 inhibits in vitro immunoglobulin production by human lupus peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Clin Exp Immunol1997;108: 375–80
93. Jacob CO, McDevitt HO. Tumor necrosis factor-α in murine autoimmune lupus nephritis. Nature 1988: 331: 356-8
94. Gomez D, Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Molina JF, Anaya JM. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? Semin Arthritis Rheum 2004; 33: 404-13
95. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 1241-50
96. Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, et al. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. J Immunol 2001; 166: 1367-81
97. Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 344–353
98. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. Immunol Rev 1981; 55: 179–216
99. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. Cell 1994; 76: 969–76
100. McNally J, Yoo DH, Drappa J, et al. Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. J Immunol 1997; 159: 4628–36

101. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. J Clin Invest 1996; 98: 1107–13
102. Hermann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 1241–50
103. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. Immunobiology 1998; 199:265–85
104. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nat Genet 1998; 19: 56–59
105. Sheriff A, Gaipl US, Voll RE, Kalden JR, Hermann M. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin NA 2004; 30: 505-27
106. Maekawa Y, Yasutomo K. Defective clearance of nucleosomes and systemic lupus erythematosus. Trends Immunol 2001; 22: 662-3
107. Ramos-Casals M, Campoamor MT, Chamorro A, et al. Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. Lupus 2004; 13: 777-83
108. Carroll MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. Nat Rev Immunol 2004; 4: 825-31
109. Formiga F, Moga I, Pac M, Mitjavila F, Rivera A, Pujol R. Mild presentation of systemic lupus erythematosus in elderly patients assessed by SLEDAI. Lupus 1999; 8: 462–65
110. French MA, Hughes P. Systemic lupus erythematosus and Klinefelter's syndrome. Ann Rheum Dis 1983; 42: 471–73
111. Sthoeger ZM, Chiorazzi N, Lahita RG. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. J Immunol 1988;141: 91–8
112. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 282–8
113. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1999; 42: 328-37
114. Wyle FA, Kent JR. Immunosuppression by sex steroid hormones. The effect upon PHA- and PPD-stimulated lymphocytes. Clin Exp Immunol 1977; 27: 407–415
115. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. Clin Exp Immunol 1996; 106: 410–15
116. Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engleman EG. Dehydroepiandrosterone enhances IL-2 production and cytotoxic effector function of human T cells. Clin Immunol Immunopathol1991; 61: 202–210
117. Van Vollenhoven RF. DHEA in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin N Am 2000; 26: 349-62
118. Mok CC, Wong RWS. Pregnancy in systemic lupus erythematosus. Postgrad Med J 2001; 77: 157–65
119. Mok CC, Lau CS, Ho CTK, Wong RW. Do flares of systemic lupus erythematosus decline after menopause? Scand J Rheumatol 1999; 28: 360–65
120. Walker SE, Allen SH, McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. Trends Endocrinol Metab1993; 4:147–51
121. Freni-Titulaer LW, Kelley DB, Grow AG**,** McKinley TW, Arnett FC, Hochberg MC. Connective tissue disease in southeastern Georgia: a case-control study of etiologic factors. Am J Epidemiol 1989; 130: 404–9
122. Reidenberg MM, Drayer DE, Lorenzo B, et al. Acetylation phenotypes and environmental chemical exposure of people with idiopathic systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1993; 36: 971–3
123. Petri M, Allbritton J. Hair product use in systemic lupus erythematosus. A case-control study. Arthritis Rheum 1992; 35: 625–9
124. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2001; 28: 2653–6
125. Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, Norris DE. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. J Invest Dermatol 1990; 94:77–85
126. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. Lupus 1997;6: 175–80
127. Prete PE. The mechanism of action of L-canavanine in inducing autoimmune phenomena. Arthritis Rheum 1985; 28: 1198–1200
128. Herrmann M, Hagenhofer M, Kalden JR. Retroviruses and systemic lupus erythematosus. Immunol Rev 1996; 152: 145–56
129. Sanchez-Guerrero J, Liang MH, Karlson EW, Hunter DJ, Colditz GA. Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. Ann Intern Med1995; 122:430–33
130. Sanchez-Guerrero J, Karlson EW, Liang MH, Hunter DJ, Speizer FE, Colditz GA. Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 804–808
131. Font J, Cervera R, Ramos-Casals M, et al. Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 2004; 33: 217-30
132. Cervera R, Font J, Pare C, et al. Cardiac disease in systemic lupus erythematosus: prospective study of 70 patients. Ann Rheum Dis 1992; 51: 156-9
133. Weinrib L, Sharma OP, Quismorio Jr FP. A long-Term study of interstitial lung disease in systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum 1990; 20: 48-56
134. Zabaleta-Lanz M, Vargas-Arenas RE, Tápanes F, et al. Silent nephritis in systemic lupus erythematosus. Lupus 2003; 12: 26-30
135. Anaya JM, Uribe M, Perez A, et al. Clinical and immunological factors associated with lupus nephritis in patients from northwestern Colombia. Biomedica 2003; 23:293-300
136. Weening JJ, D´Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. Kidney Int 2004; 65: 521-30
137. Illei GG, Takada K, Parkin D, et al. Renal flares are common in patients with severe proliferative lupus nephritis treated with pulse immunosuppressive therapy. Arthritis Rheum 2002; 46: 905-1002
138. Anaya JM, Uribe M, Pinto LF, Matute G, Molina JF, Calle I. Nefritis Lúpica. Definición clínica, patológica y terapéutica. Rev Colomb Reumatol 2001; 8: 61-74
139. Nadeau SE. Neurologic manifestations of connective tissue disease. Neurol Clin 2002; 20:151-178
140. Trysberg E, Tatkowski A. Cerebral inflammation and degeneration in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol 2004: 16: 527-33
141. López-Medrano F, Cervera R, Trejo O, Font J, Ingelmo M. Steroid induced psychosis in systemic lupus erythematosus: a possible role of serum albumin level. Ann Rheum Dis 2002; 61: 562-3
142. Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Cervera R, et al. Cryoglobulinemia in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical characteristics in a series of 122 patients. Semin Arthritis Rheum 2001; 30: 366-73
143. Debant M, Vittecoq O, Descamps V, Le Loët X, Meyer O. Anti-TNF-alpha induced systemic lupus syndrome. Clin Rheumatol 2003; 22: 56-61
144. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. Arthritis Rheum 1992; 35:630–40
145. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus II. Markers of Disease Activity. Arthritis Rheum 2004; 50: 2048-65
146. Miret C, Font J, Molina R, et al. Bcl-2 oncogene (B cell lymphoma/leukemia-2) levels correlate with systemic lupus erythematosus disease activity. Anticancer Res 1999; 19: 3073-6
147. Font J, Pizcueta P, Ramos-Casals M, et al. Increased serum levels of soluble L-selectin (CD62L) in patients with active systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 2000; 119: 169-74
148. Raj R, Murin S, Matthay RA, Wiedemann HP. Systemic lupus erythematosus in the intensive care unit. Crit Care Clin 2002;18: 781-803.
149. Camargo JF, Tobon GJ, Fonseca N, et al. Autoimmune rheumatic diseases in the intensive care unit: Experience from a tertiary referral hospital and review of the literature. Lupus 2005; 14: 1–6
150. Cervera R, Font J, Carmona F, Balasch J. Pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus: good news for the new millennium. Autoimmun Rev 2002; 1: 354-9
151. Salmon JE, Roman MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: implications for patient management. Curr Opin Rheumatol 2001; 13: 341-4
152. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2003; 349: 2399-2406.
153. Brodsky RA, Petri M, Jones RJ. Hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin N Am 2000; 26: 377- 87
154. Ioannou Y, Isenberg DA. Current concepts for the management of systemic lupus erythematosus in adults: a therapeutic challenge. Postgrad Med J 2002; 78: 599-606
155. Gourley MF, Austin III HA, Scott D, et al. Methylprednisolone and cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. Ann Intern Med 1996; 125: 549-57
156. Mok CC, Wong RW S, Lai KN. Treatment of severe proliferative lupus nephritis: the current state. Ann Rheum Dis 2003; 62: 799-804

157. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Lupus nephritis: current issues. Ann Rheum Dis 2003; 62: 795-8
158. Contreras G, Pardo V, Leclercq B, et al. Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. N Engl J Med 2004; 350: 971-80
159. Chan TM, Li FK, Tang CSO, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. N Engl J Med 2000; 343: 1156-62
160. Houssiau FA, Vasconcelos C, D´Cruz D, et al. Immunosuppresive therapy in lupus nephritis. Arthritis Rheum 2002; 46: 2121-31
161. Levy Y, Sherer Y, George J, et al. Intravenous immunoglobulin treatment of lupus nephritis. Semin Arthritis Rheum 2000; 29: 321-7
162. Hejaili FF, Moist LM, Clark WF. Treatment of lupus nephritis. Drugs 2003; 63: 257-74
163. Merell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. J Chron Dis 1955; 1: 12-32
164. Gripenberg M, Helve T. Outcome of systemic lupus erythematosus. A study of 66 patients over 7 years with special reference to the predictive value of anti-DNA antibody determinations. Scand J Rheumatol 1991; 20: 104-109
165. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. II. Predictor variables for mortality. J Rheumatol 1995; 22: 1265-70
166. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. Arthritis Rheum 1999; 42: 46-50
167. Esdaile JM, Abrahamowicz M, MacKenzie T, Hayslett JP, Kashgarian M. The time-dependece of long-term prediction in lupus nephritis. Arthritis Rheum 1994; 37: 359-68
168. McLaughlin JR, Bombardier C, Farewell VT, Gladman DD, Urowitz MB. Kidney biopsy in systemic lupus erythematosus. III. Survival analysis controlling for clinical and laboratory variables. Arthritis rheum 1994; 37: 559-67
169. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol 2001; 1: 147-153

23

A. SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO

Mario García
Carlos Riebeling
Salvador Salinas
Juan Carlos Pérez
Aurelio López
Claudio Galarza

El síndrome antifosfolipídico consiste en la presencia de fenómenos trombóticos diversos, asociados a la demostración de anticuerpos antifosfolipídicos. Puede manifestarse como una entidad individual o, con mayor frecuencia, en asocio a otras enfermedades autoinmunes como el lupus. Los mecanismos que determinan su presencia y severidad no se conocen completamente, siendo responsable de gran morbilidad para quien lo padece. Su óptimo manejo debe incluir estrategias de profilaxis primaria y secundaria, así como anticoagulación completa en los casos agudos. El pronóstico de la entidad es variable; sin embargo, con un estricto control médico y algunas modificaciones del estilo de vida, los pacientes con este síndrome pueden lograr una mejor calidad y expectativa de vida.

Contenido

Definición y fisiopatología
Pruebas de laboratorio
Manifestaciones clínicas
SAF catastrófico
Diagnóstico diferencial
Tratamiento
Pronóstico

Definición y fisiopatología

El síndrome antifosfolipídico (SAF) se caracteriza por la aparición de trombosis a repetición (tanto venosas como arteriales o de pequeño vaso), morbilidad en los embarazos (como abortos o pérdidas fetales recurrentes) y alteraciones hematológicas (como trombocitopenia o anemia hemolítica), asociados a la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (AAF).

Este síndrome es relativamente joven en cuanto a su descubrimiento. Sin embargo en poco tiempo ha atraído fuertemente la atención no sólo de reumatólogos e inmunólogos, sino de un gran número de especialistas como cardiólogos, internistas, neurólogos, hematólogos, neumólogos, gastroenterólogos, ginecólogos y muchos más quienes se encuentran directamente en contacto con este tipo de pacientes y en quienes recae la mayoría de las veces la responsabilidad del tratamiento respectivo al ser igualmente múltiples las manifestaciones del síndrome.

Fue Graham Huges en 1983 quien individualizó dicho síndrome, más tarde se introdujo el término síndrome antifosfolipídico primario (1). Posteriormente fueron publicados algunos trabajos al respecto, incluyendo grandes series de pacientes. El grupo de Alarcón Segovia en el Instituto Nacional de la Nutrición en México (2) y el propio grupo de Huges describieron ampliamente las características clínicas de estos pacientes y sus investigaciones se enfocaron en el estudio y descubrimiento de anticuerpos dirigidos en contra de los fosfolípidos de membrana, logrando un mejor entendimiento del síndrome. En los inicios de la década de los 90s se logró determinar la necesidad de algunas proteínas como cofactores indispensables en la aparición de los fenómenos trombóticos, siendo la Beta 2 Glicoproteina 1 la más precozmente estudiada. Con el paso de los años surgieron nuevos cofactores como la proteína S y C y la protrombina, acuñándose un nuevo término: «Síndrome Antifosfolípido-Cofactor».

Como se comentó anteriormente, el SAF se caracteriza por episodios de trombosis arterial o venosa recurrente en diferentes territorios y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (AAF), lo que definen este síndrome (3). La variedad de eventos trombóticos es múltiple, pues suele ser frecuente la afección de vasos de diferente calibre por lo que cualquier órgano puede verse afectado. De acuerdo al Colegio Americano de Reumatología (ACR), la presencia de un criterio clínico mayor y una alteración en el laboratorio, es suficiente para establecer el diagnóstico (4).

Tabla 1. Potenciales mecanismos de trombogénesis en el SAF.

- Aumento de la adhesión plaquetaria
- Aumento de la actividad endotelial con aumento en la adhesión de monocitos
- Producción de auto anticuerpos en contra de protrombina, proteína C y proteína S
- Producción de anticuerpos antilipoproteínas que aumentan el riesgo aterogénico
- Activación del complemento

Muchos términos han sido utilizados como sinónimos del SAF; sin embargo, la mayoría de ellos, como el «síndrome del anticoagulante lúpico» o «síndrome anticardiolipina» son inespecíficos o se prestan para confusión (5).

El SAF puede ocurrir en asociación con otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), síndromes de sobreposición, artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conectivo y otras patologías, denominándosele SAF secundario; sin embargo, puede aparecer sin evidencia suficiente de la presencia de otras patologías co-existentes (SAF primario) (6).

A pesar de los múltiples estudios realizados hasta el momento y de la evidencia de un estado protrombótico que no deja lugar a dudas, los mecanismos específicos de la trombofilia no han sido del todo aclarados. Entre las hipótesis relacionadas se encuentran defectos en la función endotelial, en los mecanismos de apoptosis celular, la exposición incontrolada de fosfolípidos de membrana que forman neoepítopes en conjunto con algunos otros cofactores, precipitando así invariablemente la cascada de coagulación con resultados catastróficos (7). La serie de eventos que conducen a hipercoagulabilidad y trombosis recurrente pueden afectar cualquier órgano o sistema y se estudiarán en detalle más adelante (Tabla 1).

Como se ha comentado previamente, la trombogénesis puede afectar cualquier órgano individual o sistema manifestándose de múltiples formas. En la Tabla 2 y 3 se enumeran de manera general las manifestaciones clínicas y de laboratorio más frecuentes, respectivamente.

Tabla 2. Características clínicas del SAF.

- Trombosis venosa profunda
- Neurológico (Enfermedad vascular cerebral, arteriotrombosis, trombosis del seno longitudinal)
- Síndrome similar a la esclerosis múltiple y otras mielopatías
- Síndromes neurológicos focales
- Corea
- Lesiones renales
- Hematológico (Anemia hemolítica/Trombocitopenia)
- Ginecológico-Obstétrico (Abortos a repetición / Eclampsia)
- Respiratorio (Embolismo pulmonar / Hipertensión pulmonar)
- Cutáneo (Livedo reticularis / Úlceras cutáneas)
- Cardiovascular (Vegetaciones de Libman-Sacks, infarto de miocardio)
- Ocular (trombosis retiniana)
- Adrenal (Infarto o hemorragia suprarrenal)
- Músculo esquelético (necrosis avascular de cadera)

Tabla 3. Características de laboratorio del SAF.

- Anticuerpos anticardiolipina
- Anticuerpos antifosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina
- Anticuerpos anti-b2-glicoproteína I
- Proteinuria

La frecuencia actual estimada del SAF es desconocida, pues pueden documentarse AAF de membrana hasta en la mitad de pacientes con otras enfermedades inmunológicas y hasta en el 2% de la población general, lo que los hace poco específicos en ausencia de una clínica compatible (8). Por otro lado, recientes estudios han encontrado AAF hasta en el 24% de pacientes que han sufrido un evento previo de trombosis a cualquier nivel, lo cual también dificulta las cosas ignorándose, si se trata de un hallazgo importante como fuente génica o sólo como un epifenómeno inespecífico (8). Así mismo, a pesar que las manifestaciones clínicas de la trombosis son variadas, su severidad no suele serlo y la muerte o discapacidad suelen ser finales frecuentes independientes del territorio afectado e independientemente de los hallazgos de laboratorio.

Aunque no existe un predominio de raza, se han encontrado casos muy severos y catastróficos con una mayor frecuencia en países africanos y en menor medida en la población hispana (9). Las mujeres son las más frecuente y severamente afectadas, aunque esta afectación puede guardar relación sólo con la ya conocida mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes en el sexo femenino. Por otro lado, es común su aparición en edades tempranas, con reportes de casos en niños menores de edad (10).

Diferencias entre SAF primario y secundario

No existen claras diferencias en el comportamiento clínico de ambos cuadros; sin embargo, algunos datos específicos como la valvulopatía, los bajos niveles de C4, la linfopenia y la neutropenia tienen mayor frecuencia cuando el SAF se asocia al LES; no obstante, estas diferencias no son suficientes para hacer fácil la primera impresión clínica. Los eventos trombóticos tienen similar frecuencia y severidad en ambos casos y también en ambos su asociación con HLA DR4 y DR7 no suele ser significativa (11). Desde el punto de vista clínico, los signos que ayudan a diferenciar al SAF primario del secundario se muestran en la Tabla 4. En la Tabla 5 se enumeran las principales enfermedades autoinmunes que pueden cursar con presencia de AAF. Es importante recalcar que la sóla presencia de estos anticuerpos no es diagnóstica del síndrome como tal. Igualmente, en la Tabla 6 se enumeran las principales infecciones en las que se ha reportado la presencia de estos anticuerpos.

Mecanismos de trombosis

La trombosis puede tener lugar en venas o arterias de pequeño, mediano o gran calibre con una presentación episódica e impredecible. Entre las más frecuentes destacan las trombosis venosas en las extremidades inferiores, trombosis de la vena renal, el síndrome de Budd-Chiari, el embolismo pulmonar, la enfermedad de Addison, la trombosis retiniana, la trombosis portal, la trombosis axilar, el infarto de miocardio, mesentérico, cerebral y la trombosis de la arteria renal (12). Más adelante describiremos en detalle las manifestaciones del SAF en diferentes órganos o sistemás.

Tabla 4. Datos clínicos que deben hacer sospechar SAF secundario.

1. Rash malar o discoide
2. Úlceras orales
3. Artritis
4. Serositis
5. Proteinuria persistente
6. Linfopenia
7. Anticuerpos anti DNA

Tabla 5. Enfermedades autoinmunes en las que se observan anticuerpos antifosfolípidos.

- Lupus eritematoso sistémico
- Artritis reumatoide
- Esclerosis sistémica
- Síndrome de Sjögren primario
- Dermatomiositis-polimiositis
- Artropatía psoriásica
- Vasculitis
  - Panarteritis nodosa y poliarteritis microscópica
  - Arteritis de células gigantes
  - Enfermedad de Behçet
  - Policondritis recidivante
  - Vasculitis leucocitoclástica
  - Enfermedad venooclusiva inflamatoria mesentérica
  - Capilaritis
  - Otros tipos de vasculitis

Tabla 6. Infecciones en las que se observan anticuerpos antifosfolípidos.

Virales
· Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana
· Mononucleosis
· Rubéola
· Parvovirus
· Hepatitis A, B y C
· Parotiditis
Bacterianas
· Sífilis
· Enfermedad de Lyme
· Tuberculosis
· Lepra
· Endocarditis infecciosa
· Fiebre reumática
· Infección por especies de Klebsiella
Protozoarias
· Paludismo
· Toxoplasmosis

Las principales teorías fisiopatológicas asociadas al SAF evocan la unión de la B2- glicoproteina 1 a la fosfatidilserina y la unión de los anticuerpos a la primera (13). Esta unión induce la expresión de moléculas de adhesión lo que secundariamente activa la cascada de coagulación y por último la trombosis.

In vitro, los anticuerpos antifosfolípidos aumentan la adhesión de leucocitos al endotelio (14); en el ámbito experimental se ha podido comprobar la competición que

los anticuerpos antifosfolípidos presentan con la anexina en la placenta de algunos animales lo que permite la formación de trombosis local (15); sin embargo, se cree que no es único el mecanismo de producción de trombosis en esta entidad y al parecer son múltiples los fenómenos que co-existen en un terreno propicio (Figura 1).

Trastornos hematológicos

La manifestación hematológica más frecuente del SAF es la trombocitopenia, la cual aparece hasta en un 25% de los pacientes. Por lo general, no suele ser grave manejando cifras de plaquetas promedio de entre 50.000 y 100.000 (16) y las manifestaciones hemorrágicas suelen ser menores e infrecuentes. De acuerdo con reportes recientes se cree que su origen se debe a la presencia de anticuerpos en contra de glicoproteínas plaquetarias específicas como la GPIIb/IIIa y la Ib/IX (17). Sin embargo, este origen no ha sido del todo comprobado y en vista de la poca relevancia clínica que este hallazgo tiene en los cuadros leves no es tan importante, a diferencia de los casos catastróficos, donde se pueden presentar cifras menores a 20.000 e incluso 10.000 plaquetas con manifestaciones hemorrágicas graves e incluso comportamientos mortales como el de la coagulación intravascular diseminada (18).

Otra manifestación frecuente es la anemia hemolítica autoinmune aislada o asociada a trombocitopenia (Síndrome de Evans) (19). Los mecanismos patogénicos de esta no están completamente aclarados, pero se cree que los AAF pueden unirse también en forma directa a la membrana de hematíes causando la lisis; no obstante, algunas teorías manejan también otros factores como la formación de anticuerpos antieritrocitarios específicos o inmunocomplejos fijados a los hematíes (20).

Pruebas de laboratorio

1. VDRL

El test de «Venereal Disease Research Laboratory» fue la primera prueba detectada como positiva en el SAF, empero, su positividad en individuos sanos o con algunas otras enfermedades lo hace una prueba poco específica y con un valor predictivo positivo sumamente bajo por lo cual no es considerada una prueba diagnóstica (21).

2. Anticoagulante lúpico (AL)

El anticoagulante lúpico es una inmunoglobulina IgG o IgM que prolonga el tiempo de coagulación total in vitro, al aglutinar los fosfolípidos presentes en el plasma evitando su participación como cofactores en la cascada de coagulación, siendo el hallazgo más frecuente el bloqueo de la conversión de protrombina en trombina (Figura 2). Debido a que los fosfolípidos son poco antigénicos, se cree que el verdadero antígeno puede ser alguna variedad de proteína plasmática, lo que podría explicar la gran variedad de comportamientos clínicos existentes. Es por ello que su especificidad tampoco es del 100%.

Algunos criterios de positividad han sido descritos en la literatura.

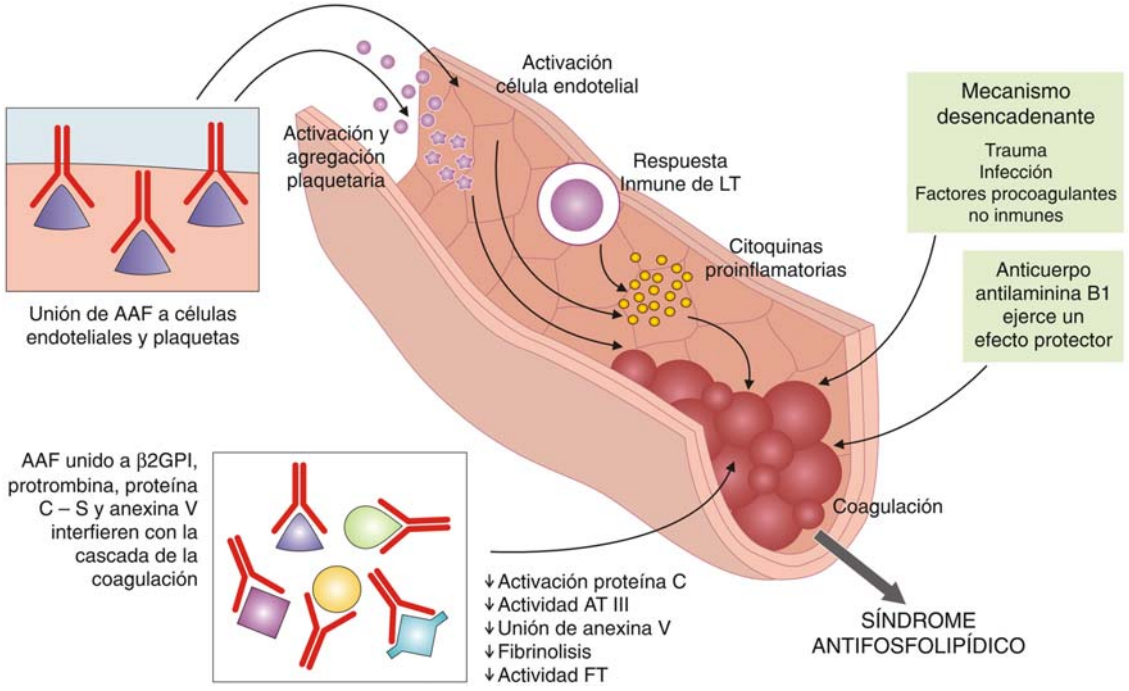


FIGURA 1.
Mecanismos patogénicos del síndrome antifosfolipídico (SAF).
Inicialmente los anticuerpos antifosfolipídicos (AAF) interfieren con la cascada de la coagulación y se unen a células endoteliales y plaquetas, lo que favorece la respuesta inmune y liberación de citoquinas proinflamatorias. No obstante se considera que existe un segundo mecanismo putativo que desencadena el fenómeno trombótico y da lugar al SAF. β2GPI: Beta 2 glicoproteína I; FT: Factor tisular; AT III: antitrombina III.

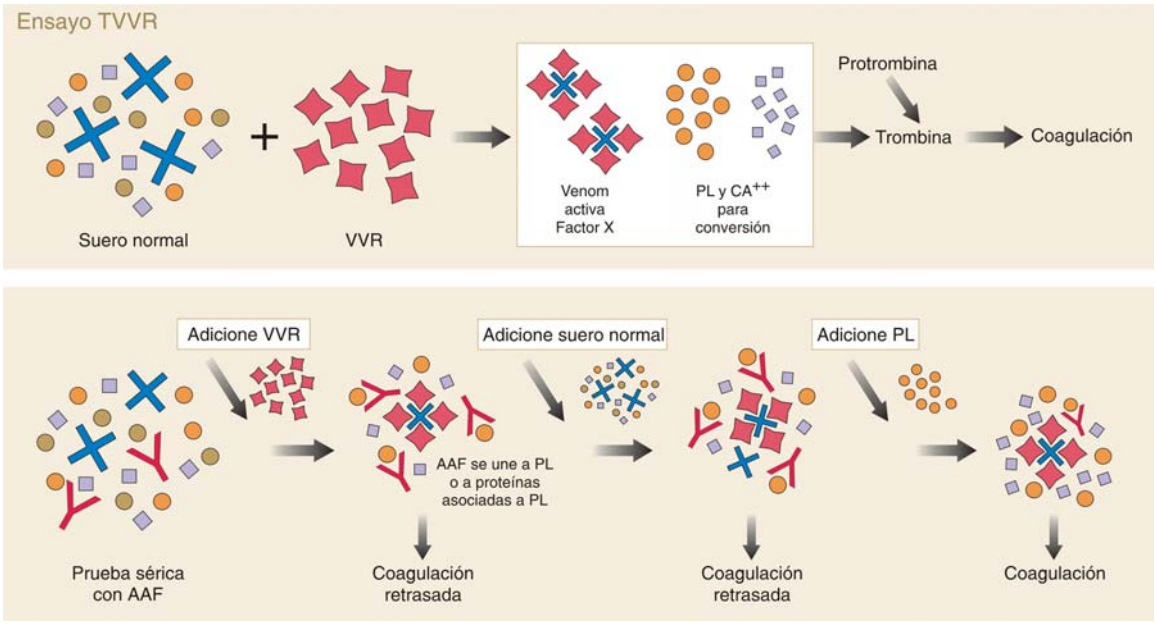


FIGURA 2.
Determinación de anticoagulante lúpico (AL).
En la parte de arriba se observa una prueba de coagulación con veneno de víbora de Russell (VVR) utilizando un suero normal, obteniendo como resultado una coagulación normal. En la parte de abajo se realiza la prueba utilizando un suero con anticuerpos antifosfolipídicos (AAF), al momento de adicionar VVR, la coagulación se retrasa por la unión de AAF a fosfolípidos (PL), la cual solo se alcanza una vez que se añade un sustrato rico en PL.

A. Anormalidad en cualquier prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos.
B. Esta anormalidad debe ser producida por un inhibidor.
C. La actividad del inhibidor debe ser dirigida a fosfolípidos, no a un factor específico de la coagulación.

3. Test de anticardiolipina (AACL)

La cardiolipina fue descubierta en principio como un importante componente de la membrana mitocondrial y es descrita como el más antigénico de todos los fosfolípidos. Los autoanticuerpos en contra de la cardiolipina fueron descritos en sus inicios mediante radioinmunoensayo y pueden ser evaluados cualitativa y cuantitativamente. El isotipo IgG es el principal predictor de trombosis y pérdidas fetales, mientras la IgM se ha asociado principalmente a anemia hemolítica. Por lo general, la mayoría de los enfermos con la presencia de anticuerpos anticardiolipina suelen tener niveles intermedios de IgG, mientras títulos mayores a 40 GPL se correlacionan fuertemente con la aparición de un cuadro clínico compatible (22).

Relación entre AL y AACL

Tanto el AL como los AACL son asociados con la aparición de manifestaciones clínicas del SAF, pero la aparición de positividad en ambas pruebas suele ser aleatoria. La positividad en una u otra no es predecible y tampoco correlaciona con la severidad del cuadro, de hecho ni siquiera la positividad en ambas tiene un valor predictivo y no permite la elaboración de juicios prematuros (22).

En presencia de una sospecha clínica suficientemente fuerte, la determinación sérica de anticuerpos anticardiolipina es importante para ayudar al clínico a establecer un diagnóstico definitivo e iniciar cuanto antes una terapia anticoagulante oportuna.

Manifestaciones clínicas

Manifestaciones cardiovasculares

Las manifestaciones cardiovasculares del SAF son múltiples y consisten principalmente en la afectación coronaria (infarto de miocardio), endocárdica (vegetaciones valvulares) y miocárdica (disfunción ventricular). La primera de ellas ocupa cerca del 30% del total de los casos de pacientes con afección cardiaca de acuerdo a la mayoría de las series (23). Por lo general, existen varios mecanismos en su génesis entre los que se destacan la trombosis intracoronaria aguda o, incluso, la ateroesclerosis acelerada; sin embargo, las cifras de aparición de este último fenómeno no son del todo conocidas. El pronóstico de este fenómeno depende en gran medida de la arteria y territorios afectados y del tiempo de atención del mismo. De tener un curso favorable y con una adecuada terapia de reperfusión, la disfunción ventricular resultante puede ser limitada manteniendo así una buena capacidad física (24). No obstante, la miocardiopatía isquémica en casos no revascularizados suele tener un mal pronóstico.

Las lesiones valvulares, por otro lado, se pueden observar en cerca del 33% de los casos y es la insuficiencia mitral la más prevalerte, aunque la regurgitación severa sólo se observa en un 4%. La afección aórtica y tricuspídea son también vistas (25). Hallazgos como el endurecimiento y la calcificación de los bordes valvulares, sobre todo en la

cara auricular son frecuentes. Las vegetaciones (Libman-Sacks) aunque menos frecuentes suelen verse en piezas de anatomía patológica y su diagnóstico es tardío en un alto número de casos.

Otros eventos observados a nivel cardiovascular en el SAF son la aparición de trombos intracavitarios (26); sin embargo para su presentación es indispensable la ausencia de ritmo sinusal, la dilatación de cavidades auriculares o una baja fracción de eyección lo que favorece la estasis y la predisposición a la trombosis. La presencia de trombos murales pueden tener un bajo riesgo embolígeno; no obstante, grandes trombos pediculados cursan habitualmente con un alto riesgo. Por lo general, su visualización es difícil en una ecocardiografia de rutina si su tamaño no es mayor a 1 cm lo cual es lo más habitual (27). Algunos casos aislados de grandes trombos murales han sido reportados e incluso se han llegado a confundir con mixomas.

Una forma poco frecuente de manifestación cardiovascular del SAF, es la miocardiopatía dilatada tanto aguda como crónica (28). La forma crónica puede ser asintomática por mucho tiempo y mantenerse estable, incluso, por años. Al ser detectada, el tratamiento se basa en la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos e inotrópicos orales como la digital. La forma aguda suele ser mortal en más del 95% (28), sigue un comportamiento similar al de la miocarditis aguda con una severa disfunción ventricular y la única terapia posible es el transplante cardiaco agudo, lo cual puede hacerse únicamente en centros especializados en algunos países del mundo. Su pronóstico a corto plazo es sumamente pobre.

Manifestaciones neurológicas

La isquemia cerebral es, sin duda, la manifestación más frecuente del SAF a nivel cerebral y aunque se puede dar en edades más tempranas, suele presentarse en pacientes con algún otro factor de riesgo cardiovascular (29). Su localización puede ser única o múltiple y los territorios afectados son aleatorios.

En dos tercios de los casos se trata de una enfermedad trombótica local y en el resto puede estar relacionados a lesiones cardiacas como fuente del trombo, destacándose entre ellas trombos murales intracavitarios o lesiones vegetantes en válvulas, especialmente mitral (29); sin embargo, las lesiones embolígenas son difíciles de documentar y la sensibilidad de una ecocardiografía transtorácica es baja. Hasta en un 25% de los casos, la arteriografía puede ser normal (29).

En otros casos, especialmente aquellos de gran severidad como en el síndrome antifosfolípido catastrófico, puede observarse la enfermedad microangiopática múltiple cuyo pronóstico es sombrío.

Según las series publicadas, hasta un 29% de los enfermos con un primer episodio pueden cursar con recurrencias a lo largo de su vida (30). Otras series como la de Krnic (31) y cols hallaron cifras de recurrencia de alrededor del 38% y otras series hasta del 50% y en casi todas ellas se logró identificar una clara relación con las titulaciones de anticuerpos AACL .

En años recientes se han reportaron casos en los que se asocio al SAF con la aparición de trombosis del seno venoso longitudinal en pacientes jóvenes sin otros factores de riesgo (32).

Los déficits cognitivos, como la demencia precoz secundaria a enfermedad multinfarto se ha asociado también al SAF. El síndrome de Sneddon (livedo reticularis y EVC recurrente) (33), cuya frecuencia es variable, cursa con demencia progresiva y evidencia de infartos corticales recurrentes por embolias o trombosis múltiples y frecuentes. Su pronóstico por lo general es pobre desde el punto de vista funcional y en el momento del diagnóstico la terapia anticoagulante es potencialmente útil.

Existen otras manifestaciones menos frecuentes del SAF a nivel neurológico, como la mielopatía transversa por trombosis de la arteria medular anterior, la amnesia transitoria global, la sordera sensorial transitoria, la amaurosis fugax, el síndrome de Guillain-Barré, la corea y las convulsiones (34).

Manifestaciones renales

El compromiso renal es una característica frecuente en el SAF. Es frecuente la trombosis de los capilares glomerulares (microangiopatía trombótica), la necrosis cortical y la trombosis de la arteria y la vena renales (35). La aparición clínica inicial suele ser variada, pero en más del 70% de los casos se ve hipertensión severa o maligna. Nochy y cols (36) reportaron en su serie de 16 pacientes la presencia de hipertensión en el 90% de los casos, la cual fue grave en el 31% de ellos y maligna en otro 12%. La presencia de insuficiencia renal aguda se encontró en el 97% y su evolución a la cronicidad se documentó en el 75%. Los hallazgos histológicos más frecuentes fueron la ateroesclerosis, la hiperplasia fibrosa de la íntima, las oclusiones arteriales y arteriolares y la microangiopatía trombótica con diversos grados de atrofia cortical focal. La aparición de anticuerpos antifosfolípido en estos casos es variable y no guarda relación con el pronóstico; sin embargo, en recientes estudios como el de Brunet (37), se encontró la presencia de anticuerpos antifosfolípidos en un 33% correspondiendo casi el 16% a anticuerpos anticardiolipina y el resto a anticoagulante lúpico.

El curso clínico de la afección renal por su parte puede ser variable, pero después de un extenso daño, como en los casos de SAF catastrófico la posibilidad de nefropatía crónica es muy alta y el pronóstico obviamente malo a mediano plazo en ausencia de una terapia sustitutiva adecuada. Cualquier forma de sustitución de la función renal como la hemodiálisis suele ser aplicada sin complicaciones especiales. En los casos tributarios de trasplante, éste suele llevarse a cabo sin complicaciones; sin embargo, algunas publicaciones como las de Mondragón (38), Radhakrishnan (39) y Knight (40), han reportado casos de rechazo del injerto principalmente en pacientes con lupus eritematoso con un pronóstico variable.

Manifestaciones pulmonares

Las manifestaciones pulmonares del SAF incluyen al embolismo pulmonar de origen tromboembólico y la trombosis microvascular pulmonar. El primero de ellos aparece en alrededor del 30% de los pacientes con SAF diagnosticado y su tasa de recurrencia es muy alta con cifras de hasta un 25% en ausencia de tratamiento anticoagulante (41). Después de un primer episodio, la aparición de nuevos eventos es exponencialmente más deletérea y desencadena invariablemente grados diversos de hipertensión pulmonar en cerca del 5% de los casos con un nefasto pronóstico y sobretodo con secuelas graves en la calidad de vida de estos enfermos (41).

Al principio, se manifiesta como intolerancia al ejercicio y disnea de esfuerzos progresivos que puede pasar desapercibida en las fases iniciales o ser atribuida a otras causas. Los cuadros súbitos y graves se deben a tromboembolismo de las ramas pulmonares principales derecha o izquierda e incluso, ocasionalmente, bilaterales en cuyo caso suelen ser catastróficos. En los casos menos graves, la aparición de hipertensión pulmonar es inevitable y desafortunadamente el tratamiento de la misma en nuestros días es inefectivo. Se han probado en estos pacientes además de la obligada anticoagulación crónica (por más de un año e incluso de por vida) algunas terapias orales con vasodilatadores del tipo de los calcio antagonistas o endovenosas como la perfusión de prostaglandinas en perfusión continua (42). En años recientes el uso de inhibidores de fosfodiesterasa como el sildenafil, vardenafil o taladalafilo se han probado en algunos grupos a nivel mundial con resultados prometedores y reducción de la presión sistólica de la arteria pulmonar mayor al 25%; sin embargo, su utilidad rutinaria está aún bajo investigación.

Manifestaciones músculoesqueléticas

La necrosis ósea es poco común y es por lo general encontrada en pacientes con enfermedades linfoproliferativas o neoplásicas como el carcinoma metastático, la anemia de células falciformes y algunas infecciones severas (43). Su asociación con el SAF es variable y es basada únicamente en algunos reportes de casos. Bulvik y cols (44) reportaron esta asociación en una mujer joven embarazada, quien presentó el cuadro 3 días después del parto. Esta misma observación fue realizada por Knickerbocker (45) en 1982 al informar la aparición de necrosis ósea en una paciente joven con eventos repetidos de tromboflebitis superficial e historia de abortos frecuentes. Más tarde, en 1997, Paydas (46) informó la ocurrencia de un episodio similar acompañado de isquemia cerebral transitoria en presencia de títulos altos de anticuerpos antifosfolípidos. Otros trabajos desde entonces como los de Murphy (47), Moore/Concannon (48) y Spyropoulos (49) han informado casos similares.

Manifestaciones del SAF en el embarazo

Entre las mujeres con pérdidas fetales frecuentes se han reportado la presencia de AAFL en cifras cercanas a un 10 a 20% (50). Aunque las pérdidas fetales son las más frecuentes y conocidas, el SAF puede ser también asociado con nacimientos prematuros, bajo peso al nacer e hipertensión gestacional (50).

El parto es de alto riesgo pues debe suspenderse la anticoagulación por lo menos una semana antes; sin embargo, para ese momento se ha reportado un éxito de 70 a 75% (51) con un tratamiento adecuado (ver Capítulo 23B).

SAF catastrófico

Dentro de las descripciones conocidas hasta el momento del SAF, se destaca una forma predominantemente aguda y devastadora, denominada por Asherson como Síndrome Antifosfolípido Catastrófico (SAFC) (52), cuadro en el que convergen de manera desencadenada múltiples oclusiones vasculares tanto en arterias medianas como pequeñas; se destaca el compromiso en múltiples órganos y un desenlace por lo general fatal.

Durante los últimos 15 años se han establecido algunos criterios diagnósticos del síndrome. Harris, en 1987, (53) incluyó en ellos la combinación de trombosis arteriales, venosas o placentarias asociadas a trombocitopenia y títulos altos de cualquier variedad de anticuerpos antifosfolípidos (predominantemente anticoagulante lúpico o anticuerpos anticardiolipina). En una serie de enfermos estudiados, la mayoría de los órganos afectados fueron en orden decreciente, pulmón, cerebro, piel y riñón con una mortalidad mayor al 60%. Dentro de la definición propuesta por Asherson se requiere de por lo menos afectación de tres o más órganos (54).

A continuación se describe brevemente la fisiopatología, aspectos clínicos, y la epidemiología del síndrome y se hace una revisión concisa de la mayoría de los trabajos importantes publicados al respecto hasta el momento.

El mecanismo del SAFC hasta el momento permanece siendo una conjetura, en la cual aparentemente coinciden diferentes formas desencadenantes de trombosis, entre las que destacan afectación de la microcirculación capilar probablemente mediada por activación de células endoteliales que liberan factores procoagulantes, una forma de vasculitis leucocitoclástica que resulta en depósitos de complejos inmunes en la pared vascular probablemente estimulados por factores activadores de monocitos o de las propias células endoteliales, lo que conjunto provee un microambiente óptimo para la precipitación de trombos en la microcirculación vascular (55). La última de las formas conocidas de microvasculopatía resulta de la activación intravascular de un subgrupo de neutrófilos con producción secundaria de complemento como factor lesivo.

Como vía común en donde convergen los tres mecanismos comentados están los anticuerpos antifosfolípido que representan un excelente ejemplo de la trombosis mediada por complejos inmunes. Entre ellos se encuentran la beta 2 glicoproteina 1, la protrombina, la anexina V y los kininógenos de alto y bajo peso molecular (56). Dichas proteínas, así como algunas otras, tienen la capacidad de unirse a ciertas superficies fosfolipídicas facilitan-

do la unión bivalente de anticuerpos antifosfolípido formando así señales transmembrana que resultan en una "activación" de las células afectadas entre las que se encuentran, monocitos, plaquetas, y las mismás células endoteliales; estas últimas, que requieren para este fenómeno de algunas proteinas mediadoras como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la E selectina, moléculas cuya expresión promueve un estado procoagulante.

Hasta el momento no se conoce el mecanismo exacto que justifique el aumento en la expresión de los anticuerpos antifosfolípidos, no obstante, recientemente se han relacionado algunos probables detonadores entre los que se destacan las infecciones. Asherson y cols. han postulado la asociación del síndrome a infección bacteriana hasta en 26 % de los casos. En otro porcentaje de los casos, la neumonía y la septicemia han sido reportadas como predecesoras de la tormenta trombótica y en algún caso anecdótico se ha documentado infección por Salmonella Typhi, sospechándose que algunos lipopolisacáridos de este germen pudieran tener efectos inmunológicos e invocar fenómenos trombóticos en individuos vulnerables.

Después de una amplia revisión se han encontrado formas complejas de aparición con afectaciones multiorgánicas en un período de tiempo (días o semanas) debutando por lo general con los datos respectivos del primer órgano afectado. La acrocianosis, el livedo reticularis, los infartos cutáneos y la gangrena digital son datos frecuentes en la afección cutánea, y se presentan de manera súbita en un 4 % de los casos de SAF (56). Los infartos en órganos sólidos como suprarrenales, hígado, testículo y próstata, se ha reportado en conjunto hasta en un 26 % de los pacientes (57). La afección renal presente hasta en un 80% de los individuos se acompaña frecuentemente de hipertensión arterial severa con evidencia de microangiopatía trombótica de pequeños lechos en la biopsia renal. 67% de los pacientes han sufrido afección pulmonar con distress respiratorio en casi la mitad de ellos por lo general en relación a tromboembolismos múltiples e incluso a hemorragias intraalveolares cuyo mecanismo no ha sido documentado con certeza. En más del 50 % de los pacientes se ha encontrado compromiso del sistema nervioso central a manera de infartos múltiples o trombosis del seno longitudinal, sin embargo, son los hallazgos anatomopatológicos los más frecuentemente encontrados en piezas postmortem, donde los microinfartos múltiples aparecen en la mayoría de pacientes.

Las manifestaciones cardiacas han sido descritas hasta en el 48 % de los reportes aunque la aparición de infartos miocárdicos extensos ocurre poco. Las microembolias subendocárdicas en el material histopatológico son frecuentes pero por lo general no tienen repercusión clínica. La afectación abdominal, caracterizada por oclusiones vasculares mesentéricas con necrosis intestinal secundarias, trombosis de la porta y de la cava inferior y trombosis en las venas suprahepáticas, han sido también reportadas.

En un estudio publicado en 1998, que recopila las características generales de presentación del SAFC en las series hasta ahora publicadas, se muestran en orden decreciente los posibles detonantes del síndrome. Estos son: infecciones respiratorias superiores, las infecciones intestinales, el puerperio, procedimientos invasivos como resección prostática transuretral, cirugías como la histerectomía, procedimientos mínimos como la extracción dental o algunos medicamentos como las tiacidas y el captopril, aunque metodológicamente no se puede dar peso estadístico a estas asociaciones. Así mismo, dicho trabajo evalúa el pronóstico final de los enfermos estudiados en esas series. Se observó recuperación (independiente del órgano afectado) en 25 de 50 pacientes (58) y muerte en la otra mitad. De las series estudiadas hasta el momento, algunas de ellas han reportado apariciones atípicas del SAFC, por ejemplo con trombosis másiva de médula ósea, los vasos retinianos, las arterias de miembros inferiores y otras aún más atípicas.

De las series revisadas, la mayoría coincide en que más del 60% de los casos de SAFC, han ocurrido en mujeres, siendo el restante 40% de presentación másculina con un promedio de edad que va de los 8 a los 75 años y una media de 34 años. El 55% de los casos han tenido lugar de manera aislada (catalogados como SAFC primario), el 30% se ha asociado a Lupus Eritematoso Generalizado, el 12% a otras formás similares al Lupus y el 3% a algunas otras enfermedades del tejido conectivo (SAFC secundario).

El hallazgo más común en enfermos con aparición catastrófica del SAF es la trombocitopenia menor de 100.000 x mm^3, en 65% de los casos. Otros hallazgos de laboratorio también frecuentes son la existencia de anemia microcítica hipocrómica y niveles elevados del LDH sugestivos de hemólisis en el 25% de los reportes, alteración en las pruebas de coagulación del tipo de la hipofibrinogenemia en el 27%, eritrocitos fragmentados y otras evidencias de daño microangiopático en otro 27%. El anticoagulante lúpico suele aparecer en más del 90% de los pacientes, cifras elevadas de presentación que comparte con los anticuerpos anticardiolipina. Más de la mitad de los casos suelen cursar con otros autoanticuerpos siendo en orden decreciente los anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti DNA bicatenario, anticuerpos extraíbles del núcleo y anticuerpos antiribonucleoproteina (RNP).

Algunos autores que han informado casos únicos de ciertas formas atípicas de presentación han encontrado algunas anormalidades de laboratorio, como la leucocitosis, la prolongación del tiempo de protrombina, la hipocomplementemia, la positividad para factor reumatoide, el aumento en la velocidad de eritrosedimentación y la positividad de la prueba de VDRL. Todas ellas con poca especificidad para el SAFC por lo que su presencia debe ser analizada con cautela.

Las potenciales causas desencadenantes del SAFC se resumen a continuación.

Infecciones

Las infecciones se han relacionado hasta en un 43% de los casos de SAF (59); sin embargo, esta cifra puede

ser poco real, pues es conocida la amplia relación de procesos infecciosos también con otras enfermedades inmunológicas. Originalmente, como es sabido, fue reportada la asociación de los anticuerpos AFL con presencia de pruebas positivas para sífilis (serología positiva), virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, algunas bacterias, e incluso infestaciones parasitarias como malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis (60). Se ha observado que la mayoría de las infecciones asociadas al SAF no ejercen un papel patológico como tal ni se encuentran activas al momento del diagnóstico de SAF. Por otro lado, es claro que la presencia de algunos antígenos de histocompatibilidad HLA (DR4 o DR7) predisponen a una tendencia a la no infección y potencialmente inducen a la mutación de anticuerpos anticardiolipina.

En una serie experimental, Gharavi (61) y colaboradores demostraron la inducción de mielitis transversa y pérdidas fetales en ratones mediante la administración de b2GP1 de origen viral. En otra investigación, este mismo grupo logró desencadenar efectos similares al generar AAFL patológicos mediante la exposición a antígenos de CMV y HIV. Otros estudios son conducidos actualmente mediante la administración de antígenos de *Haemophilus influenza* y *Neisseria gonorrhae* con resultados prometedores. Durante los últimos simposios desde el año 2000, han proliferado múltiples trabajos de investigación asociando al SAF con un sinnúmero de infecciones incluido sífilis, leishmaniasis, HCV, varicela y otros.

Otra teoría que asocia las infecciones al SAF es la teoría de los superantígenos. En ella se postula que algunas moléculas antigénicas de la superficie de ciertas bacterias como el stafilococo (enterotoxinas) pueden aumentar la actividad de las células T y con ello sobreactivar a las células B generando la producción AAFL y con ellos la activación subsecuente de la cascada de coagulación (62).

En resumen, ya sea por la inducción de AAFL patogénicos, que ocurre como resultado de una mimetización molecular entre componentes bacterianos, víricos o parasitarios y la beta 2GPI similarmente a lo que ocurre en la fiebre reumática o por la producción o generación de súper antígenos los procesos infecciosos han sido asociados fuertemente al desencadenamiento del SAF en sus formás activas; no obstante, en el momento actual existen nuevas y emergentes teorías que darán datos más adelante.

Trauma

Después de las infecciones, que fueron comentadas con anterioridad, el segundo factor potencialmente precipitante del SAFC es el trauma incluyendo en él a los procedimientos quirúrgicos mayores y menores, fracturas óseas y trastornos metabólicos (63). Durante todos y cada uno de estos procesos es bien reconocido el hecho de la liberación exagerada de citoquinas, factor tisular y otros productos propios de las respuestas metabólicas ante el estrés de cualquier tipo. No es infrecuente la aparición o debut de un cuadro grave de trombosis del seno longitudinal durante un trabajo de parto difícil o las trombosis venosas profundas en extremidades inferiores en pacientes con cirugías ortopédicas recientes. Sin embargo, a pesar del conocimiento observacional de este fenómeno, distamos mucho de poder establecer los criterios o factores de mal pronóstico en este tipo de enfermos y mucho más aún determinar cuales podrían ser las medidas profilácticas para evitar la aparición del SAF en este contexto.

Suspensión de anticoagulantes

Curiosamente, la suspensión de la terapia anticoagulante oral sobretodo con warfarina, previo a las realización de procedimientos invasivos o quirúrgicos como manipulaciones dentales, coronariografías o cirugías menores se ha asociado a la aparición de eventos trombóticos algunas semanas posteriores (64). Se han observado incluso, de acuerdo a a la literatura algunos casos de SAF catastrófico asociados sobretodo a niveles bajos de INR. Esta asociación se ha establecido hasta en un 10% de los casos lo que ha obligado a los grupos interesados a nivel mundial a revisar cuidadosamente la intensidad o duración de la terapia anticoagulante en los pacientes con SAF conocido.

Hipótesis de la tormenta trombótica

Hace apenas unos años, Kitchens (65) estableció la hipótesis de la tormenta trombótica basada en una serie de 6 pacientes reportados. En ella se menciona una formación incontrolada de trombina como respuesta "fisiológica" ante una falsa depresión del sistema fibrinolítico. Otros fenómenos como la reducción de la ATIII, la proteína C y S y la beta 2GP1 también fueron observados en estos casos. Sin embargo, en la actualidad no puede establecerse hasta donde interfiere cada teoría en la producción de eventos trombóticos.

Neoplasias y enfermedades linfoproliferativas

Es bien conocido que en cualquier paciente con antecedente de trombosis inexplicable es imperativo un riguroso escrutinio de búsqueda de neoplasias ocultas. En las primeras series al respecto, neoplasias del tipo del carcinoma de ovario, el cáncer de células pequeñas de pulmón, el linfoma B fueron las más frecuentes. Recientemente la asociación entre SAF y neoplasia fue revisada por Asherson y Cervera (66).

Desde 1885, Trousseau tomo especial atención en la aumentada frecuencia de eventos trombóticos en pacientes con neoplasias conocidas (67). Muchos mecanismos desde entonces se han implicado. Entre ellos se destacan el hallazgo de algunos tipos de fibrinopéptidos séricos elevados hasta en un 60% de los pacientes con cáncer. Otras sustancias relacionadas son derivados de proteasas dependientes de vitamina K que son aparentemente producidas por múltiples células neoplásicas. En la actualidad los tipos de neoplasias asociadas al SAF son múltiples y no es el objetivo de la obra el mencionar a cada uno de ellos, sin embargo algunos de ellos se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7. Neoplasias asociadaas con eventos trombóticos.

· Enfermedades linfoproliferativas
· Adenocarcinoma gástrico
· Colangiocarcinoma
· Carcinoma uterino
· Carcinoma de células renales
· Carcinoma de pulmón
· Carcinoma pancreático

Cabe mencionar la poca o nula asociación entre los eventos trombóticos y la evolución de la neoplasia, pues la aparición del primero puede incluso tener lugar meses o años antes de la aparición del segundo.

Dada la falta de ensayos controlados, no se puede establecer con certeza un tratamiento óptimo para los enfermos de SAF catastrófico, por lo que todas las medidas utilizadas hasta el momento han sido solamente empíricas. Si partimos de la base de que el SAFC es una entidad trombofílica y microvascular, se puede suponer que la anticoagulación es un tratamiento útil al bloquear la fase final de la cascada de coagulación. Las drogas inmunosupresoras, por otro lado, pueden coadyuvar en un posible beneficio al inhibir la producción de mediadores (anticuerpos antifosfolípidos, citoquinas, productos de degradación del complemento y anticuerpos anticélulas endoteliales), lo que en conjunto podría aliviar el estado hipercoagulable. Hasta el momento para tales fines se ha probado el uso crónico de cumarínicos y esteroides, así como sesiones periódicas de plasmaféresis o gammaglobulina intravenosa (68). El éxito de estas medidas terapéuticas no ha podido ser probado con certeza por la falta de estadísticas al respecto, problema al que también se enfrentan el uso de dosis altas de ciclofosfamida y el manejo empírico a base de fibrinolíticos como la estreptoquinasa.

Si bien es cierto que la forma catastrófica y devastadora del SAFC ocurre en un número limitado de enfermos con síndrome antifosfolípido, su mortalidad y morbilidad importantes lo hacen tributario de un estudio extenso en el futuro, sobre todo para recopilar datos que ayuden a esclarecer con mayor certeza sus mecanismos fisiopatológicos y si es posible las estrategias terapéuticas útiles. Su mortalidad, cercana al 50 % se debe a microvasculopatía trombótica en diferentes órganos y sistemás donde el riñón, pulmón, cerebro, corazón y piel ocupan los primeros lugares de afectación, correspondiendo a estos órganos, las manifestaciones clínicas encontradas.

La etiología de la enfermedad por el momento permanece siendo un misterio pero cada día adquieren mayor relevancia algunos mecanismos, inherentes al endotelio vascular y a la expresión de algunos factores tisulares y moléculas de adhesión, con alteración en los factores de coagulación fosfolípido dependientes y la probable presencia de plaquetas disfuncionales. El porque de la presentación maligna del síndrome antifosfolípido en ciertos individuos y un comportamiento indolente en otros, es una pregunta que no ha podido ser contestada, lo cual seguramente, se debe a la poca frecuencia de casos reportados, o bien al infradiagnóstico de un buen porcentaje de ellos.

Otras hipótesis

La similitud entre el comportamiento de la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) y los cuadros graves del SAF o SAF catastrófico es evidente. Es por ello que se han lanzado algunas otras teorías bajo investigación que postulan el hallazgo de multímeros de factor von Willebrand encontrados en pacientes con PTT y que quizás guardan relación con la adhesión de plaquetas al subendotelio después del daño vascular (69). La existencia de estos multímeros no ha sido del todo comprobada.

Otras teorías evocan la posible convergencia de múltiples factores sincrónicos que alteran por un lado la función endotelial, las plaquetas, el complemento y la cascada de coagulación. Todos estos mecanismos podrían responder aisladamente y confluir en un individuo genéticamente predispuesto; sin embargo, es poco probable que teniendo diferentes mecanismos desencadenantes o factores predisponentes pudieran todos ello coincidir en el tiempo generando un síndrome clínico.

Diagnóstico diferencial deL SAF

El diagnóstico diferencial en el SAF depende de las manifestaciones clínicas con las que los enfermos cursan al momento del debut. Cuando la trombosis es la manifestación principal, deficiencias de proteína C, proteína S, AT III y otros estados procoagulantes como policitemia, trombocitosis, disfibrinogenemia, hemoglobinuria paroxística nocturna, hiperhomocisteinemia o uso de anticonceptivos orales deben ser descartados. En los casos de pérdidas fetales frecuentes deben descartarse previamente otras causas ginecológicas como miomatosis uterina, endometriosis e incluso alteraciones hormonales sin pasar por alto las alteraciones genéticas en el feto tanto cromosómicas como anatómicas, infecciones intercurrentes, etc.

Tratamiento

Estrategias de profilaxis. Eliminar otros factores de riesgo trombótico alternos como el uso de contraceptivos orales, la hipertensión o la hiperlipidemia es de utilidad y disminuye el riesgo trombótico. El uso de dosis bajas de aspirina se ha usado ampliamente y aparentemente tiene cierta repercusión en la prevención primaria. Otros antiagregantes plaquetarios como el clopidogrel se ha usado anecdóticamente y pueden usarse en casos de alergia a la aspirina también en prevención primaria (70). Por otro lado, en casos de prevención secundaria, la antiagregación plaquetaria no ha mostrado ser suficiente dejando a los anticoagulantes orales el papel más importante.

La anticoagulación total endovenosa o subcutánea es el método de elección y su seguridad ha sido bastante comprobada en los casos agudos y subagudos. La terapia oral a largo plazo después de un evento documentado es la tera-

pia de elección, manteniendo un INR entre 2.6 y 3 con una duración mínima de 6 meses. En casos recurrentes y de alto riesgo hay quien apoya el mantenimiento de cifras de INR entre 3 y 4 y el uso de los anticoagulantes de forma indefinida. La combinación de aspirina y anticoagulación oral se ha probado por algunos grupos, pero su efectividad no ha sido del todo comprobada.

En casos de pérdidas fetales recurrentes, el uso de heparina no fraccionada o de bajo peso molecular y de aspirina coadyuvante es la terapia más aceptada en la actualidad (71). Este tratamiento como es de suponer, debe ser suspendido días antes del parto y reiniciarse terminado el mismo hasta por un período de alrededor de 6 semanas postparto. Los esteroides en estos casos no han probado ser de utilidad.

Pronóstico

En las formás asintomáticas y no catastróficas, con medicación apropiada y algunas modificaciones del estilo de vida la mayoría de los individuos pueden tener una calidad de vida razonablemente normal. Sin embargo, existen subgrupos de pacientes con variedades especialmente peligrosas, quienes sufren de eventos recurrentes a pesar de un tratamiento anticoagulante óptimo lo que incide directamente en su morbilidad y mortalidad. Los pacientes con SAF secundario, tienen un pronóstico directamente relacionado a la enfermedad autoinmune asociada como el LES; en el caso de las primarias los datos epidemiológicos son tan diversos que no permiten realizar un análisis adecuado y establecer un pronóstico específico.

En el caso de las mujeres con pérdidas fetales frecuentes, se suele tener un pronóstico razonablemente bueno en presencia de aspirina o heparina de bajo peso molecular en los embarazos subsecuentes.

Referencias

1. Hughes GRV, Asherson RA. Formes atypiques du lupus erythemateux dissemine. Actualites nephologiques. Flammarion Medicine; Paris, 1984.
2. Alarcon-Segovia D, Sanchez-GuerreroJ. Primary antiphospholipid syndrome. J Rheumatol 1989;16:482-8
3. Pérez-Vazquez ME, Villa A, Drenkard C, et al. Influenece of disease duration, continued follow up and further antiphospholipid testing on the frecuency and classification category of antiphospholipid syndrome in a cohort of patients with SLE. J Reumatol 1993;20:437-42
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome.Report of an international Workshop. Arthritis Rheum 1999;42:1309-11
5. Sebastiani GD, Galeazzi M,Morozzi G, Marcolongo R. The inmunogenetics of the antiphospholipid syndrome, antiacrdiolipin antibodies, and lupus anticoagulant. Semin Arthrithis Rheum 1996;25:414-20
6. Merkel P, Chang Y, Pierangeli S, Convery K, Harris N, Polisson R. The prevalence and clinical assocation of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. Am J Med 1996; 101:576-83
7. Roubery RAS. Mechanisms of autoantibody-mediated thrombosis. Lupus 1998;7:S114-9
8. Bongard O, Reber G, Bounameaux H, et al. Anticardiolipin in acute venous thromboembolism. Thromb Haemost 1992;67:724
9. Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with SLE. J Rheumatol 1997;24:291-6
10. Petri M, RheinschmidtM, Whitiing-O Keefe Q, et al. The frecuency of lupus anticoagulant in SLE. A study of 60 consecutive patients by activated partial trhomboplastin time, Rusell viper venom time and anticardiolipin antibody. Ann Int Med 1987;106:524-31
11. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" anthiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. Medicine 1989;68:336-74
12. Font J, Lopez-Soto A, Cervera R, et al. The «primary» antiphospholipid syndrome: antiphospholipid antibody pattern and clinical features of a series of 23 patients. Autoimmunity 1991;9:69-75
13. Lutters BC, Meijers JC, Derksen RH, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes. J Biol Chem 2001; 276:3060-7
14. Delezé M, Alarcon-Segovia D, Oria CV, et al. Hemocytopenia in SLE. Relationship to antiphospholipid antibodies. J Rheumatol 1989;16:9 26-30
15. Jacob H Rand. Antiphospholipid Antibody-mediated disruption of the annexin-V antitrhombotic shield: A Thrombogenic Mechanism for the antiphospholipid syndrome.J Autoimm 2000;15:107-11
16. Finazzi G. The Italian Registry of antiphospholipid antibodies. Haematologica 1997;82:101-5
17. Galli M, Daldossi M, Barbui T. Antiglycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. Trhomb Haemost 1994;71:571-5
18. Asherson RA, Cervera R, Pittie JC, A et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients. Medicine 1998;77:195-207
19. Guzman J, Cabral AR, Cabiedes J, et al. Antiphospholipid antibodies in patients with idiopatic autoimmune haemolytic anemia. Autoimmunity 1994;18:51-6
20. Lang B, Straub RH, Weber S, et al. Elevated anticardiolipine antibodies in autoimmune haemolytic anaemia irrespective of underlying SLE. Lupus 1997; 6:652-5
21. Moore JE, Mohr CF. Biologic false-positive test for syphilis: type, incidence and cause. JAMA 1952;150:467-73
22. Ghiardello A, Doria A, Ruffatti A, et al. Antiphospholipid antibodies (aPL) in SLE. Are they specific tooles for the diagnosis of aPL syndrome. Ann Rheum Dis 1994;53:140-2
23. Adler Y, Kinkelstein Y, Zandeman –Goddard G, et al. The presence of antiphospholipid antibodies in acute myocardial infarction. Lupus 1995;4:309-13
24. Vaarala O,Manttari M, Manninem V, et al. Anticardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. Circulation 1995;91:23-7
25. Khamashta MA, Cervera R, Asherson RA. Association of antibodies against phospholipids with heart valve disease in systemic lupus erythematosus. Lancet. 1990;335:1541-4
26. Lubbe WF, Asherson RA. Intracardia trombus in systemic in SLE associated with lupus anticoagulant. Arthritis Rheum 1988;31:1453-54
27. Espinola-Zavaleta N, Vargas-Barron J, Colmenares-Galvis T, et al. Echocardiographic evaluation of patients with primary antiphospholipid syndrome. Am Heart J 1999;137:973-8
28. Leung W-H, Wong K-L, Lau C-P, et al. Association between antiphospholipid antibodies and cardiac abnormalities in patients with SLE. Am J Med 1990;89:411-9
29. Levine SR, Brey RL, Saeaya KL, et al. Recurrent stroke and thrombo - occlusive events in the antiphospholipid syndrome. Ann Neurol 1995; 38:119-124
30. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. Adv Immunol 1991;49:193-280
31. Krinic-Barre S, Reister O´Connor C, Looney SW, et al. A retrospective review of 61 patientes with APL. Arch Intern Med 1997;157:2101-8
32. Carhuapoma JR, Mitsias P, Levine SR. Cerebral Venous Trombosis and anticardiolipin antibodies. Neurology 1997;28:2363-9
33. Kalashnikova LA, Nasonov EL, Kushekbaeva AE, et al. Anticardiolipin antibodies in Sneddon's Syndrome. Neurology 1990; 40:464-7
34. Jackson C, Brey RL, Barohn E, et al. Anticardiolipin antibodies in Guillain Barre Syndrome. Clin Exp Rheumatol 1992;10:657
35. Harris EN, Gharavi AE, Boey C, et al. Anticardiolipin antibodies. Detection by radioimmunoassay and asociation with thrombosis in SLE. Lancet 1983;2:1211-4
36. Nochy D, Daugas E, Droz D, et al. The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. J Am Soc Nephrol 1999;10:507-18

37. Brunet P, Aillaud MF, San Marco M, et al. Antiphospholipid in hemodialisis patients: relationship between lupus anticoagulant and thombosis. Kidney Int 1995;48:794-800
38. Mondragón-Ramirez G, Bochicchio T, Garcia-Torres R, et al. Recurrent renal thrombotic angiopathy after kidney transplantation in two patients with primary antiphospholipid syndrome. Clin Transplant 1994;8:93-6
39. Radhakrishnan J, Williams GS, Appel GB, et al. Renal transplantation in anticardiolipin antibody-positive SLE patients. Am J Kidney Dis 1994;23:286-9
40. Knight RJ, Schanzer H, Rand JH, et al. Renal allograft thrombosis associated with the antiphospholipid antibody syndrome. Transplantation 1995;60:614-5
41. KoikeT, Tsutsumi A. Pulmonary hypertension and the antiphospholipid syndrome. Intern Med 1995;34:938-40
42. Humbert M, Sanchez O, Fartoukh M, et al. Treatment of severe pulmonary hypertension secondary to connective tissue disease with continue IV epoprostenol. Chest 1998;114: s80-2
43. Ramos-Casals M, Cervera R, Lagrutta M, et al. Clinical features related to antiphospholipid syndrome in patients with chronic viral infections (hepatitis C virus/HIV infection): description of 82 cases. Clin Infect Dis 2004;38:1009-16
44. Bulvik S, Aronson I, Ress S, et al. Extensive bone marrow necrosis associated with antiphospholipid antibodies. Am J Med 1995;98:572-4
45. Knickerbocker WJ, Quenville NF. Widespread marrow necrosis during pregnancy. Skeletal Radiol 1982;9:37-40
46. Paydas S, Kocak R, Zorludemir S, Baslami F. Bone marrow necrosis in antiphospholipid syndrome. J Clinical Pathol 1997;50:261-2
47. Murphy PT, Rao P. Central retinal venous occlusion with co-existent thrombotic thrombocytopenic purpura and antiphospholipid syndrome. Br J Ophthalmol 2003;87:658-9
48. Moore J, Ma DD, Concannon A. Non-malignant bone marrow necrosis: a report of two cases. Pathology 1998;30:318-20
49. Talmadge DB, Spyropoulos AC. Purple toes syndrome associated with warfarin therapy in a patient with antiphospholipid syndrome. Pharmacotherapy 2003;23:674-7
50. Nilsson IM, Astedt B, Hedneau U, et al. Intrauterine death and circulating anticoagulant (anti-thromboplastin) Acta Med Scand 1975; 197:153
51. Soulier JP, Boffa MC. Avortement repetition thormboses et anticoagulant circulant antithromboplastin. Nouv Presse Med 1980;9:859-64
52. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients. Medicine (Baltimore) 1998;77:195-207
53. Harris EN, Bos K. An acute disseminated coagulopathy-vasculopathy associated with the antiphospholipid syndrome. Arch Intern Med 1991;151:231-2
54. Asherson RA, Cervera R, Pittie JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: Clinical and laboratory features of 50 patients. Medicine 1998;77:195-207
55. Belmont HM, Abramson SB, Lie JT. Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus. Interactions of inflammatory cells and activated endothelium. Arthritis Rheum 1996;39:9-22
56. Abramson SA, Belmont HM. SLE: mechanims of vascular injury. Hospital Practice 1998;33:107-27
57. Argento A. DiBenedetto RJ. ARDS and adrenal insufficiency associated with the antiphospholipid antibody syndrome. Chest 1998;113: 1136-8
58. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, et al. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. N Engl J Med 1995;332:993-7
59. Hojnik M, Gilburd B, Ziporen L, et al. Anticardiolipin antibodies in infections are heterogeneous in their dependency on (2-glycoprotein I: Analysis of anticardiolipin antibodies in leprosy. Lupus 1994;3:515-21
60. Blank M, Krause I, Shoenfeld Y. Molecular mimicry: lessons from experimental models of systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Book: Molecular Mimicry, Microbes and Autoimmunity, Chapter 16, 2000, Edited by M.W. Cunningham and R.S. Fujinami. 2000 ASM Press, Washington D.C.
61. Gharavi A E, Harris EN, Asherson RA, et al. Antiphospholipid antibodies: Isotype distribution and phospholipid specificity. Ann Rehum Dis 1987; 46:1-6
62. Zhang L, Jacobsson K, Strom K, et al. Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. Microbiology 1999;145:177-83
63. Chinnery PF, Shaw PG, Jackson GH, et al. Fulminant encephalopathy due to the catastrophic primary antiphospholipid syndrome (letter). Neurol Neurosurg Psych 1997;62:300-1
64. Asherson RA, Chan JK. Harris EN, et al. Anticardiolipin antibody, recurrent thrombosis and warfarin withdrawal. Ann Rheum Dis 1985;44:823-5
65. Kitchens C. Thrombotic Storm. Am J Med 1998;164:381
66. Asherson RA. The Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. Lupus 1998:7: 555-62
67. Trousseau A. Phlegmásia alba dolens in : Clinique medical díHotel Dieu de Paris. Vol. 3. London. The New Sydenham Society 1865:94.
68. Neuwelt CM, Daikh DI, Linfoot JA, et al. Catastrophic antophospholipid syndrome. Response to repeated plasmapheresis over three years. Arthritis Rheum 1997;40:1534-9
69. Petras T, Rudoph B Filler G, Zimmering M, et al. An adolescent wit acute renal failure, thrombocitopenia and femoral vein thrombosis. Nephr Dial Trasplant 1998;13:480-3
70. Le Loet X, Vittecoq O, Joen-Beades F, Tron F. Catastrophic antophospholipid syndrome. Presse Medicale 1997;26:131-4.
71. Kupferminc MJ, Eldo A, Steinman N, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in woman with complications of pregnancy. N Engl J Med 340:9, l999
72. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. In: Kelly WR, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. Textbook of Rheumatology. 5th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1997:1057-64
73. Goel N. Antiphospholipid antibody syndrome: current concepts. In: Hospital Practice (Off Ed) [serial online]. New York, NY: McGraw-Hill; 1998;33:129-130
74. Hojnik M, George J, Ziporen L, et al. Heart valve involvement (Libman-Sacks endocarditis) in the antiphospholipid syndrome. Circulation 1996 15;93:1579-87
75. Petri M. Pathogenesis and treatment of the antiphospholipid antibody syndrome. Med Clin North Am 1997;81:151-77
76. Pittoni V, Isenberg D. Apoptosis and antiphospholipid antibodies. Semin Arthritis Rheum 1998;28:163-78
77. Wallace DJ. The use of chloroquine and hydroxychloroquine for non-infectious conditions other than rheumatoid arthritis or lupus: a critical review. Lupus 1996;5: S59-64
78. Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. Peripheral vascular syndromes associated with systemic lupus erthematosus. Ann Intern Med 1965; 62:416-430
79. Asherson RA. Sub-lingual splinter haemorrhages: a new sign of the antiphospholipid coagulopathy? Ann Rheum Dis 1990;49:268
80. Asherson RA, Cervera R. Review: Antiphospholipid antibody and the lung. J Rheumatol 1995:22:62-6
81. Asherson RA, Piette JC. The Catastrophic Antiphospholipid Syndrome in 1996. Acute multi-organ failure associated with antiphospholipid antibodies. A review of 31 patients. Lupus 1996:5:414-7
82. Asherson RA, Harris EN, Hughes GRV, et al. Complications of oral contraceptives and antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum 1988: 31:575-6
83. Petrovas C, Vlachoyiannopolos PG, Kordossis T, et al. Antiphospholipid antibodies in HIV infection and SLE with or without anti-phospholipid syndrome; comparisons of phospholipid specificity, avidity and reactivity with beta2-GPI. J Autoimmun 1999;13:347-55.
84. Gonzalez C, Leston A, Garcia-Berrocal B, et al. Antiphosphatidylserine antibodies in patients with autoimmune diseases and HIV-infected patients: effects of Tween 20 and relationship with antibodies to beta2-Glycoprotein I. J Clin Lab Anal 1999;13:59-64
85. Uthman I, Tabbarah Z, Gharavi AE. Hughes Syndrome associated with cytomegalovirus infection. Lupus 1999;8:775-7
86. Cheng HM, Khairullah NS. Induction of antiphospholipid autoantibody during cytomegalovirus infection. Clin Infect Dis 1997;25:1493-4
87. Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropin-releasing and urocortin suppress encephalomyelitis effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. J Immunol 1997;158:5751-6
88. Asherson RA. Antiphospholipid antibodies, malignancies and paraproteinemias. J Autoimmun 2000;15:117-22
89. Derksen DHWM, de Groot PG. Do we know which patients with the antiphospholipid syndrome should receive long-term high dose anticoagulation? J Autoimmun 2000;15:255-60
90. Schved JF, Dupuy-Fons C, Biron C, et al. A prospective epidemiological study of the occurrence of antiphospholipid antibody: The Montpellier Antiphospholipid (MAP) study. Haemostasis 1994;24:175-82
91. Tobin MJ. Culmination of an era in Research on the Acute Respiratory Distress Syndrome. N Engl J Med 2000;342:1360-1
92. Nogare D. Septic shock. Am J Med Sci 1991;302:50-65

23

B. SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO Y EMBARAZO

Claudio Galarza
Roger A. Levy
Mario García
Norma Serrano
Ricard Cervera

La relación entre pérdida gestacional y síndrome antifosfolipídico ha sido ampliamente reconocida desde hace varios años. La falta de estandarización de los criterios utilizados en los grupos estudiados, permite una amplia variabilidad en la prevalencia reportada de este síndrome en el embarazo. Aunque se han postulado múltiples mecanismos patogénicos responsables de esta asociación, la fisiopatología precisa del problema aún no se conoce completamente. La presencia previa de pérdida gestacional o trombosis, además de su relación con otras enfermedades autoinmunes como el lupus, permiten diferenciar varios grupos de pacientes, en los cuales el esquema de tratamiento a iniciar es diferente. Aunque establecer un pronóstico en esta entidad es difícil, se acepta como una causa tratable de pérdida gestacional, siendo la estrecha relación médico-paciente, un requisito fundamental para lograr los mejores resultados.

Contenido

Criterios y clasificación
Patogénesis de la pérdida gestacional
Hallazgos clínicos
Hallazgos de laboratorio
Tratamiento
Futuro

Introducción

La relación que existe entre la pérdida gestacional y los anticuerpos antifosfolipídicos es formalmente reconocida desde hace más de 20 años. Hoy se acepta que el *síndrome de trombosis autoinmune sistémico o síndrome antifosfolipídico* (SAF) es una causa tratable de pérdidas fetales, así como preembrionarias y embrionarias recurrentes. (1)

La prevalencia de SAF durante la gestación varía de acuerdo a la población estudiada y los criterios utilizados para la medición de los Anticuerpos Antifosfolípidos (AAF). Los AAF son encontrados en mujeres con embarazos normales, pero su prevalencia es baja. El Anticoagulante Lúpico (AL) se ha encontrado en el 0,2% y Anticuerpos Anticardiolipina (AAC) en el 2% de mujeres con gestaciones normales. (2)

Entre un 7 a un 25% de los abortos recurrentes no explicados por otras causas se deben a la presencia de AAF (1). En mujeres con pérdida de la gestación la prevalencia de AAC varía entre un 4,6% a 50,7% con una media de 15,5% y la prevalencia de AL varía entre 0 a 14% con una media de 8,3%; sin embargo, en mujeres con pérdida gestacional por encima de la semana 20, la prevalencia llega a ser tan alta como del 30% (2). La diferencia entre estos porcentajes se puede explicar por la diversidad de los grupos estudiados; por ejemplo: pacientes con diferentes criterios de inclusión, la falta de estandarización de los métodos de detección de los AAF.

Durante la gestación el SAF, además de la pérdida gestacional, se ha asociado con todos los estados de disfunción placentaria durante los tres trimestres de la gestación: restricción del crecimiento intrauterino, preeclampsia, parto pretérmino y pérdida de la gestación (3-5).

Criterios y clasificación de las pérdidas gestacionales en el SAF

Los criterios de mayor aceptación para el diagnóstico de SAF son los derivados del simposio internacional realizado en Sapporo, Japón, en 1999, "criterios de Sapporo". Estos criterios definen la pérdida fetal en el SAF como:

1. Una muerte fetal, por encima de la semana 10 de gestación con feto morfológicamente normal demostrado por ultrasonografía o exploración directa del feto.
2. Uno o más partos prematuros como aquel parto presentado en la semana 34 de edad gestacional o antes, como consecuencia de preeclampsia grave o insuficiencia placentaria.
3. Tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la semana 10 de gestación después de descartar anomalías cromosómicas maternas, paternas, fetales y otras causas conocidas de pérdida gestacional.

Los criterios de laboratorio requeridos para el diagnóstico de pérdida de la gestación por SAF son: una prueba de AL positiva, o títulos moderados o altos de AAC medidos por IgG o IgM, realizados al menos en dos ocasiones con intervalos de 6 semanas (6).

Es importante señalar que la pérdida gestacional esporádica es frecuente y no siempre se reconoce por parte de las mujeres. Se estima que casi un 50% de todas las concepciones pueden fracasar. De los embarazos reconocidos de un 10 al 12 % culminan en un aborto espontáneo, en la mayoría de estos casos (= 80%) son pérdidas preembrionarias o embrionarias (1).

Mecanismos patogénicos de la pérdida gestacional asociada a AAF

Los experimentos con modelos murinos del SAF han demostrado una relación causal directa entre AAF y pérdida de la gestación. La inoculación de suero de mujeres con títulos altos de AAF a ratas normales induce reabsorción de la gestación en estados iniciales (7) y la inmunización activa con anticuerpos anticardiolipina monoclonales patógenos, induce manifestaciones clínicas de SAF en ratas BALB/c (8). Esto demuestra que el suero de mujeres con SAF es altamente teratogénico para los embriones de ratas, efectos que se han demostrado tanto en cultivo de preembriones como durante el crecimiento embrionario en la gestación (9). Sin embargo, el suero como tal, tiene múltiples componentes y por ende se requiere de la purificación de éste para establecer los verdaderos factores causales. La purificación de la fracción de IgG en el suero de mujeres con SAF y posteriormente inoculada a ratas en gestación, logró evidenciar un efecto directo sobre el saco de yolk y el embrión, reduciendo su crecimiento (10).

Es bien conocido que los AAF requieren un cofactor (apolipoproteína H o β2 glicoproteína 1 (β2GP1)). La β2 GP1 es una glicoproteína altamente glicosilada con cinco dominios "sushi", que interactúan con los fosfolípidos de membrana por medio de su domino V, rico en lisina. La unión de AAF con β2GP1 forma un complejo divalente que incrementa su afinidad por la membrana fosfolipídica (11). El papel funcional de β2GP1 aún no ha sido dilucidado, pero se conoce que la deficiencia de esta glicoproteína no parece estar asociada con la enfermedad. La unión de AAF-β2GP1 a las membranas celulares incluyendo el trofoblasto, lleva a daño y activación de citoquinas tales como IL-3, la cual se ha asociado en el proceso de implantación embrionaria (12).

Modelos experimentales por medio de inmunización activa de ratas normales con β2GP1 humana, con péptidos sintéticos representativos del sitio de unión de fosfolípidos de β2GP1, y con péptidos sintéticos de origen microbiano que compartían secuencia y propiedades funcionales con el sitio de unión de fosfolípidos de β2GP1, indujeron cifras altas de AAF, capaces de provocar pérdidas de la gestación en algunas cepas de ratones (13-15). Sin embargo, estos experimentos que indican que los AAF son causantes de pérdidas gestacionales no explican los mecanismos por los cuales dichas pérdidas se producen.

Se considera que los efectos patológicos de los AAF están mediados por tres mecanismos: trombosis, interferencia con el balance prostaciclina tromboxano y alterando las moléculas de adhesión entre los componentes del trofoblasto (16).

El estado de hipercoagulabilidad inducido por los AAF produce trombosis e infartos placentarios, vasculopatía de las arterias espirales, que conducen a una insuficiencia útero-placentaria, que lleva a restricción del crecimiento intrauterino, signos de hipoxia como anomalías en la frecuencia cardiaca fetal, oligohidramnios, sufrimiento fetal, parto pretérmino o pérdidas de la gestación.

La vasculopatía de las arterias espirales de la placenta disminuye el flujo normal de sangre materna al espacio intravelloso, dificultando el intercambio de gases y nutrientes al feto. Esta insuficiencia útero-placentaria puede concluir, dependiendo de su gravedad, en restricción del crecimiento fetal y, en el peor de los casos en la pérdida del producto.

Con el objetivo de diferenciar la patología placentaria del SAF de la característica del lupus, Magid et al., analizaron 40 placentas. No encontraron correlación con la actividad de la enfermedad con incremento de aborto espontáneo, prematuridad y restricción del crecimiento fetal. En las placentas los hallazgos fueron compatibles con hipoxia-isquemia, vasculopatia decidual, trombosis, villitis crónica y peso placentario más bajo. En las placentas con SAF fueron encontradas largas áreas de infarto correlacionadas a anomalías fetales (17).

Con las coloraciones histopatológicas comunes no es posible distinguir las placentas del SAF de las de toxemia. Además, los hallazgos en las placentas de SAF son disociados de los resultados fetales. La distribución de laminina y colágeno IV está incrementada en las placentas de SAF, y no de las pacientes con toxemia sin SAF. Una posible explicación es la tentativa de regeneración del tejido placentario en SAF (18).

Existen diferentes hipótesis sobre los mecanismos por los que los AAF pueden causar un estado de hipercoagulabilidad. Entre los más aceptados están:

1. Los AAF pueden alterar el equilibrio eicosanoide, disminuyendo la producción de prostaciclina y aumentando la producción de tromboxano (potente vasoconstrictor que aumenta la agregación plaquetaria) por las células endoteliales (19,20).
2. Existe reactividad cruzada entre los AAF y los glicosaminoglicanos, familia de sustancias parecidas a la heparina que intervienen en las propiedades no trombóticas del endotelio vascular. La inhibición de la función de los glicosaminoglicanos por los AAF, puede en parte, explicar la trombosis que ocurre en estos pacientes (21).
3. Los AAF pueden inducir un efecto procoagulante mediante la inhibición de la activación de la vía de proteínas C-S dependiente de fosfolípidos (22).
4. La reducción de la anexina V (proteína placentaria anticoagulante) producida por la competencia entre esta y los AAF, por la unión a fosfolípidos, puede llevar a un estado de hipercoagulabilidad placentaria (23).

Además de los mecanismos protrombóticos descritos, actualmente se debate la posibilidad que exista un daño directo, *no protrombótico*, ocasionado por los anticuerpos antifosfolipídicos en el trofoblasto (24). La implantación o nidación del embrión al endometrio es un proceso dinámico en el cual se desarrollan una serie de eventos que involucran estrechamente al trofoblasto y la decidua. La implantación uterina requiere que el embrión esté en el sitio de implantación en un estado competente para realizar la nidación. Cualquier alteración en el estado funcional del trofoblasto puede ocasionar un fracaso en la implantación.

Existe evidencia en modelos experimentales de SAF, que sugieren que los AAF pueden actuar directamente en el trofoblasto, alterando su diferenciación y maduración, produciendo daño celular directo, apoptosis, inhibición de la formación del sincitio, disminución de la gonadotropina coriónica y alteración de la implantación (10, 25, 26).

La β2GP1 es uno de los blancos antigénicos más importantes para los AAF, su presencia en la membrana trofoblástica explica el tropismo de los anticuerpos antifosfolipídicos por la placenta. Estos hallazgos ayudan a entender por qué, luego de una infusión pasiva de AAF a ratas embarazadas, estos anticuerpos desaparecen de la circulación periférica y se acumulan en los tejidos placentarios (1,2). Estos estudios sugieren que los AAF pueden afectar directamente al funcionamiento del trofoblasto, provocando alteraciones en la implantación, sin provocar necesariamente eventos trombóticos.

La infección se ha planteado como otro mecanismo que pudiese llevar al SAF. En modelos experimentales con ratones la inmunización con *Hemophilus influenza, Neisseria gonorrhea*, toxina tetánica lleva al desarrollo de anticuerpos contra β2GP1 (27). La inoculación de estos anticuerpos en ratas gestantes resulta en un cuadro clínico de SAF, incluyendo trombocitopenia, tiempo parcial de tromboplastina activada prolongado e incremento de pérdidas de la gestación. En humanos la infección con varicela se ha asociado con SAF (28).

También se ha propuesto la posibilidad que exista una predisposición genética para desarrollar SAF, evidenciado por los grandes estudios familiares y poblaciones en los cuales se ha encontrado que varios miembros en una familia pueden tener AL y ACC positivos con o sin evidencia clínica de SAF. Esta tendencia familiar puede estar genéticamente determinada. Se han descrito asociaciones positivas entre AAF y antígenos leucocitarios DR o DQ. Por otra vía un polimorfismo en el gen que codifica para la β2GP1, el cual determina un cambio de una valina por una leucina en la proteína madura, se ha estudiado como un posible factor de riesgo genético para tener anticuerpos anti β2GP1 y SAF (29).

El mecanismo de las pérdidas gestacionales en el SAF es heterogéneo, complejo y aún no está del todo dilucidado, estudios futuros que indaguen otros mecanismos como, por ejemplo, el papel de componentes del sistema de complemento como el C5a, otros blancos antigénicos (péptidos de la β2GP1) y predisposición genética, nos ayudarán, ciertamente, a comprender mejor los procesos patológicos de

este síndrome (30,31). Se acepta en el presente que los AAF están asociados con restricción del crecimiento fetal y sufrimiento, desencadenando prematuridad y muerte fetal. Estas complicaciones son consecuencia de la insuficiencia útero-placentaria subsecuente a múltiples infartos, trombosis y vasculopatía de la arteria espiral. Los principales blancos son las plaquetas, células endoteliales, mecanismos anticoagulantes y las vías fibrinolíticas (32).

Hallazgos clínicos

Las manifestaciones clínicas del SAF son numerosas y con un espectro que puede ir desde moderado a severo, afectando sólo la gestación o asociado a otros fenómenos autoinmunes. Varios de los hallazgos sistémicos del síndrome pueden ser explicados por la vasculopatía y oclusión de pequeños vasos debido a la agregación plaquetaria y posterior trombosis, lo cual puede desencadenar trombosis venosa, trombosis arterial, embolización pulmonar, isquemia cerebral transitoria, infartos renales y otras condiciones. En el embarazo los AAF se han asociado como causa de pérdida de la gestación en cualquier trimestre, disfunción placentaria en el tercer trimestre, restricción del crecimiento intrauterino, preeclampsia, parto pretérmino y muerte fetal. Cada uno de estas manifestaciones puede estar asociada o no a trombocitopenia. Generalmente se encuentra una placenta pequeña que al estudio histopatológico evidencia alteraciones vasculares.

Recientemente se ha reportado que el SAF es una causa de pérdida preclínica de la gestación y por ende asociado con infertilidad. Aunque los trabajos clásicos de Lyden et al (33), donde se evidencia el efecto de los AAF en el desarrollo de trofoblasto, soportan el concepto de asociación entre AAF e infertilidad, varias investigaciones han fallado en confirmar dicha asociación (34).

Muchas de las pérdidas de la gestación debidas a SAF ocurren posteriores al primer trimestre de la gestación, por lo tanto en el 86% de los abortos en mujeres con SAF se logra identificar previamente actividad cardiaca fetal, pero solo el 43% de los abortos en mujeres sin SAF se logra identificar fetocardia.

Hallazgos de laboratorio

La presencia de AAF puede detectarse mediante pruebas coagulométricas (AL) o inmunológicas en fase sólida (AAC). Las técnicas reagínicas (serología luética falsamente positiva) ya no se utilizan por su baja sensibilidad.

Anticoagulante lúpico

La determinación del AL tiene mayor especificidad, pero menor sensibilidad diagnóstica que los ACC para SAF, aunque la mayoría de los pacientes son positivos para ambos. La presencia de AL se muestra como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de episodios trombóticos, especialmente arteriales, en pacientes con SAF (35).

Anticuerpos anticardiolipina

Su determinan se realiza por medio del método de ELISA que permite la identificación del isotipo y la cuantificación de los títulos. Para que la unión de los AAC a su antígeno se produzca, es necesario la presencia de un cofactor plasmático: la β2GP1. En consecuencia, existen AAC dependientes de β2GP1, que están asociados a procesos trombóticos y AAC no dependientes de β2GP1, que se identifican principalmente en el curso de diferentes infecciones y no tienen relación con las manifestaciones clínicas del síndrome (Figura 1) (36). El isotipo IgG AAC es el que mejor se correlaciona con los fenómenos trombóticos.

Anticuerpos anti β2-Glicoproteína 1

Diferentes estudios han establecido que entre los diferentes isotipos de aβ2GP1, es la IgG el que mejor se correlaciona con la presencia de AL y con los principales fenómenos del SAF. Su detección puede ser de utilidad en aquellos pacientes que presentan manifestaciones clí-

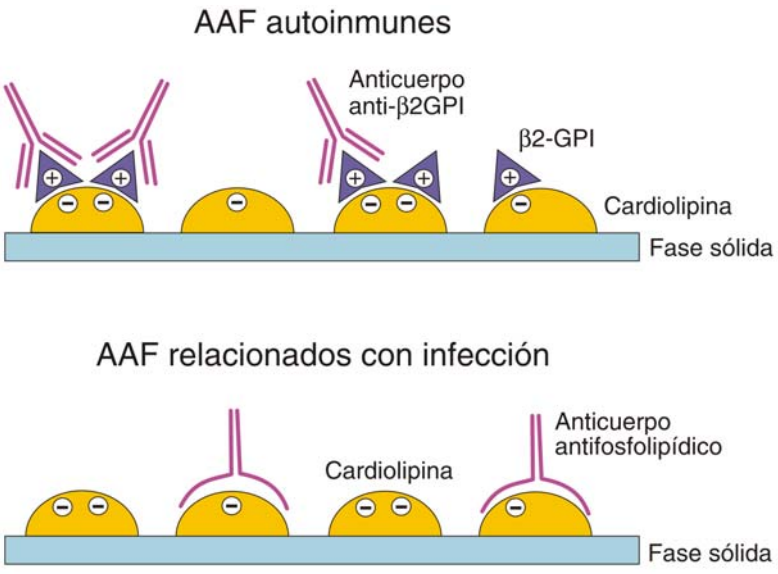


FIGURA 1.
Determinación de anticuerpos antifosfolípidos por ELISA.
Arriba: unión de AAF autoinmunes a cardiolipina a través del cofactor beta 2 glicoproteína I (β2GPI).
Abajo: unión de AAF relacionados con infección a cardiolipina no mediada por cofactor.

nicas de SAF en los cuales las determinaciones de AAC y AL han sido varias veces negativas. Los aβ2GP1 con más específicos y poseen mayor valor predictivo positivo que los AAC para el SAF, sin embargo, los aβ2GP1 no se consideran un factor de riesgo trombótico independiente de los AAC (35).

Anticuerpos antiprotrombina

Se encuentran hasta en un tercio de los pacientes con SAF. Se detectan por ELISA y su presencia ha sido asociada a manifestaciones trombóticas en diferentes estudios, sin embargo, la investigación sobre la utilidad clínica de estos autoanticuerpos continúa en desarrollo, por lo que aún no se recomiendan para tamizaje rutinario. Adicionalmente, se han detectado otros autoanticuerpos contra fosfolípidos de carga negativa como fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, o bien neutra como fosfatidiletanolamina, pero su utilidad en la práctica clínica parece limitada a aquellos casos que presentan manifestaciones clínicas de SAF, pero han sido serológicamente, por varias ocasiones negativas. En los pacientes con SAF también se han encontrado otros autoanticuerpos como los anticuerpos antianexina V, anti-proteína C, anti-proteína S, anti-trombomodulina, anti-LDL oxidada (que podrían estar relacionados con la formación de placas de ateroma), antiplaquetarios, antieritrocitarios, anticélula endotelial, antinucleares y antimitocondriales (37).

Aunque hay pruebas nuevas y más específicas, la anticardiolipina ELISA y el AL todavía son ideales para el diagnóstico de SAF. Pruebas más recientes como anti-b2GP1 ELISA y APhL ELISA Kit (Louisville APL diagnostics) utilizan anticuerpos algo diferentes y posiblemente proporcionan un diagnóstico más específico (y tal vez más confiable) de SAF, en tanto conservan una sensibilidad de buena a excelente (38).

Tratamiento

El tratamiento del SAF obstétrico debe incluir a un equipo multidisciplinario de especialistas como gineco-obstetras, reumatólogos, hematólogos, que tengan experiencia en el manejo del síndrome. El éxito del tratamiento se basa no sólo en la intervención medicamentosa, sino también en el estricto control y seguimiento durante todo el embarazo e inclusive en el período preconcepcional.

El manejo farmacológico del SAF obstétrico es todavía controversial, y por esto es necesario individualizar a los pacientes ya que los múltiples estudios no nos han proporcionado aún una evidencia sólida, para permitirnos establecer esquemas rigurosos de tratamiento. De la misma manera, la existencia de subgrupos clínicos de SAF obstétrico, dificulta que esquemas farmacológicos estrictos sean empleados.

Sin embargo, para fines prácticos podríamos dividir a las pacientes con SAF obstétrico en diferentes grupos.

1. Pacientes con AAF positivos, sin historia de pérdida gestacional o trombosis, sin o con enfermedad autoinmune concomitante.
2. Pacientes con historia de dos o más pérdidas gestacionales y la presencia de AAF positivos.
3. Pacientes con múltiples pérdidas gestacionales asociadas a SAF con o sin LES o trombosis previa o ambos.

Grupo 1

Son pacientes en los que se detectó por alguna razón la presencia de los AAF en el suero. Estos pacientes presentan una preocupación justificada, por la existencia de los anticuerpos y la forma como estos podrían influir en un futuro embarazo. En estas mujeres un control estricto de su embarazo sin intervención farmacológica alguna, sería la estrategia apropiada.

Grupo 2

En este grupo de pacientes en los cuales se ha diagnosticado previamente un SAF obstétrico, es muy importante discutir ampliamente con ellas sobre el riesgo que implica para su embarazo la presencia de estos anticuerpos y los diferentes esquemas que podrían ser utilizados para su tratamiento. La participación activa de la paciente en la decisión sobre la estrategia a seguir en su caso particular es esencial. La paciente debe conocer los riesgos y beneficios del tratamiento así como la importancia de la adherencia al mismo.

Las pautas que se pueden proponer a estas pacientes son:

a. Aspirina (81-100 mg) preconcepcional y luego durante todo el embarazo y las 4 primeras semana del puerperio (39).
b. Aspirina (81-100 mg) preconcepcional y al momento de confirmarse el embarazo, se añadirá heparina de bajo peso molecular diariamente, durante todo el embarazo y las 2 primeras semanas del puerperio.

Con respecto al primer esquema se debe explicar al paciente que la posibilidad de éxito es alta, los efectos secundarios mínimos y el costo bajo. En caso de que este esquema fallara, se debería seguir al siguiente esquema, agregando al tratamiento del siguiente embarazo la heparina de bajo peso molecular.

Debemos considerar que estos embarazos son muy esperados y muchas pacientes luego de la explicación de las opciones de tratamiento, prefieren comenzar con el segundo esquema ante la posibilidad que el primero fallara.

Grupo 3

El tercer grupo incluye pacientes con SAF secundario y/o historial previo de trombosis. En este grupo la estrategia individual para el manejo es esencial. En los pacientes que estén utilizando dicumarínicos, por trombosis previas, se debe interrumpir la administración antes de la 6ª semana de embarazo. El riesgo de teratogenia por dicumarínicos es máximo entre las 6 y 12 semanas de embarazo (40). Los glucocorticoides fluorados (beta y dexametasona) se utilizan solo en el riesgo de parto prematuro, o los no fluorados (prednisona y prednisolona) por razones no obstétricas, como, por ejemplo, activación del proceso lúpico o

trombocitopenia (41). El esquema para la prevención de las pérdidas gestacionales, en este grupo de pacientes, es de aspirina a bajas dosis combinado con la administración diaria de heparinas de bajo peso molecular. La heparina regular o no-fraccionada puede ser utilizada. Esta tiene que ser inyectada dos veces en el día y se debe administrar la dosis suficiente para incrementar la relación del PTT basal de la paciente para 1,5-2,0 veces.

En todas las pacientes el seguimiento por ultrasonografía es importante para la monitorización del crecimiento fetal y el estado de la circulación útero-placentaria. Esto ayudará a tomar decisiones en caso de que se presentaran complicaciones y se deba adelantar el parto. Se recomienda realizar el seguimiento mensual del crecimiento intrauterino y del volumen del líquido amniótico. Estudios con Doppler del flujo de la arteria umbilical se deben realizar entre la semana 20-24 del embarazo, para detectar aquellas gestantes con un riesgo incrementado a desarrollar preeclampsia o insuficiencia útero-placentaria (42). Desde la semana 30 los estudios ultrasonográficos pueden ser realizados con mayor frecuencia, dependiendo de la evolución del embarazo y el criterio del equipo médico.

A pesar del tratamiento, la pérdida gestacional puede ocurrir en un 20-30% de los casos (43). La utilización de glucocorticoides está condenada para estos casos (44). El tratamiento ideal para SAF obstétrica sin respuesta a la heparina con aspirina es todavía desconocido. La inmunoglobulina endovenosa es reservada para estos casos y utilizada en combinación con heparina en dosis anticoagulante con dos inyecciones subcutáneas por día y aspirina en bajas dosis. El dicumarínico es utilizado en algunos centros mientras las semanas 14 y 34, en pacientes con pasado de accidente vascular cerebral o trombosis arteriales importantes (45).

Consideraciones sobre el futuro

La estandarización de los métodos de laboratorio, la necesidad de afinar los criterios de inclusión para el tratamiento de las pacientes, debido a la existencia de subgrupos clínicos, buscar terapias dirigidas a los mecanismos causantes del síndrome, ya que la terapia antiagregante y anticoagulante es sintomática, entre otras, son las tareas que nos depara en el futuro el *síndrome antifosfolipídico obstétrico*.

Referencias

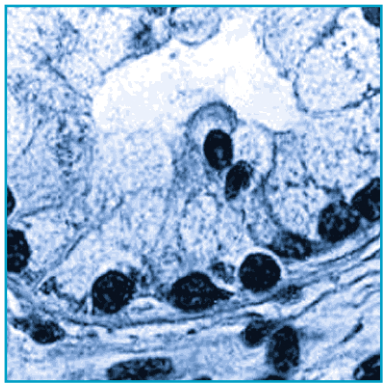
1. Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001;96:37-50
2. Drakeley AJ, Quenby S, Farquharson RG. Mid-trimester loss-appraisal of a screening protocol. Hum Reprod 1998;13:1975-80
3. Lockshin MD, Druzin ML, Goei S, et al. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 1985;31:152-6
4. Branco DW, Scott JR, Kochenour NK, et al. Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. N Eng J Med 1985; 13: 1322-6
5. Lima F, Khamashta MA, Buchanan NM, et al. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 1996; 14: 131-6
6. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification for definite antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 1999; 42:1309-11
7. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction on anti-phospholipid syndrome in naïve mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:3069-73
8. Bakimer R, Fishman P, Blank M, et al. Induction of primary antiphospholipid syndrome in mice by immunization with a human monoclonal anticardiolipin antibody (H-3). J Clin Invest 1992; 89:1558-63
9. Ornoy A, Yacobi S, Avraham S, et al. The effect of sera from women with SLE and/or anti phospholipid syndrome on rat embryos in culture. Reprod Toxicol 1998;12:185-91
10. Ornoy A, Yacobi S, Tartakover, et al. The effects on antiphospholipid antibodies obtained from women with SLE APS and associated pregnancy loss on rat embryos and placental explants in culture. Lupus 2003;12:573-8
11. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. Annu Rev Med 2003; 54: 409-24
12. Shoenfeld Y, Sherer Y, Fishman P. Interleukin-3 and pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. Scand J Rheumatol (Suppl) 1998; 107:19-22
13. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, et al. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with b2 glycoprotein 1. J Clin Invest 1992;90:1105-9
14. Garcia C, Kanbour-Shakir A, Tang H, et al. Induction of experimental antiphospholipid syndrome in PL/J mice following immunization with b2 glycoprotein 1. Am J Reprod Immunol 1997;37:118-24
15. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfeld M, et al. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance trhombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. J Immunol 1999;163:2922-7
16. Carp HJA. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. Curr Opin Obstet Gynecol 2004;16:129-35
17. Magid MS, Kaplan C, Sammaritano LR, Peterson M, Druzin ML, Lockshin MD. Placental pathology in systemic lupus erythematosus: a prospective study. Am J Obstet Gynecol 1998;179:226-34
18. Levy RA, Avvad E, Oliveira J, Porto LC. Placental pathology in antiphospholipid syndrome. Lupus 1998; 7 Suppl 2:S81-5
19. Carreras LO, DeFreyn G, Machin SJ, et al. Arterial thrombosis, intrauterine death, lupus anticoagulant: detection immunoglobulin interfering with prostacyclin formation. Lancet 1981;1:244-6
20. Schorer AE, Duane PG, Woods VL, et al. Some antiphospholipid antibodies inhibit phospholipase A2 activity. J Lab Clin Med 1992;120:67-77
21. Chamley LW, McKay EJ, Patisson NS. Inhibition of heparin/antithrombin III cofactor activity by anticardiolipin antibodies: a mechanism for thrombosis. Thromb Res 1993;71:103-11
22. Cariou R, Tobelem G, Soria C, et al, Inhibition of protein C activation by endothelial cells in the presence of lupus anticoagulant. N Engl J Med 1986;14:1193-4
23. Rand JH, Wu XX, Guller S, et al. Reduction of annexin V (placental anti-coagulant protein 1) on placental villa of women antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 1994;171:1566-72
24. Meroni PL, di Simona N, Testoni C, et al. Antiphospholipid antibodies as a cause of pregnancy loss. Lupus 2004;13:649-52
25. Sthoeger ZM, Mozes E, Tertakovsky B. Anticardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation. Proc Nat Acad Sci 1993;90:6464-7
26. di Simona N, Meroni PL, del Papa N, et al. Antiphospholipid antibodies effect trophoblast gonadotrophin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered b2-glycoprotein 1. Arthritis Rheum 2000;43:140-50

27. Blank M, Krause I, Fridkin M, et al. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-1 accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. J Clin Invest 2002;109:797-804
28. Manco-Johnson MJ, Nuss R, Ker N,et al. Lupus anticoagulant and protein S deficiency in children with postvaricella purpuar fulminans of thrombosis. J Pediatr 1996;128:319-23
29. Namjou B. Antiphospholipid syndrome: genetic review. Curr Rheumatol Rep 2003;5:391-4
30. Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. J Clin Invest 2003;112:1644-54
31. Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, et al. Prevalence and clinical correlations of antibodies against six b2-glycoprotein-1 related peptides in the antiphospholipid syndrome. J Clin Immunol 2003;235:337-83
32. Gharavi AE, Pierangeli SS, Levy RA, Harris EN. Mechanisms of pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. Clin Obstet Gynecol 2001;44:11-9
33. Lyden T, Vogt E, Ng Ak, et al. Monoclonal antiphospholipid antibody reactivity against human placental trophoblast. J Reprod Immunol 1992;22:1-14
34. Backos M, Rai R, Regan L. Antiphospholipid antibodies and infertility. Hum Fertil 2002;5:30-4
35. Orts JA, Zúñiga A, Orera M. Actualización del síndrome antifosfolípidos. Med Clin (Barc) 2003;121:459-71
36. Levy RA, de Meis E, Pierangeli SS. An adapted ELISA method for differentiating pathogenic from nonpathogenic aPL by a beta 2 glycoprotein I dependency anticardiolipin assay. Thromb Res 2004;114: 573-7
37. Cervera R, García-Carrasco M. Rojas-Rodríguez J, Asherson RA. Anticuerpos antifosfolípidos. En: Galarza-Maldonado C, Pineda Villaseñor C, Cervera Segura R, et al (ed) Trombosis en la práctica clínica. Intersistemas: Mexico 2003;113-21
38. Piereangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Pruebas de anticuerpos antifosfolipidos: problemas y soluciones. En: Branco W (ed) anticuerpos antifosfolipidos y problemas de la reproducción, Clínicas Obstétricas y Ginecológicas (México) 2001;1: 43-51
39. Balasch J, Carmona F, Creus M, et al. Management of reproductive failure in the antiphospholipid syndorme: In Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y (ed) The antiphospholipid syndrome II. Elsevier Science. 2002; 375-95
40. Ginsberg JS, Creer I, Hirsh J. Use of antithrombotic agents during pregnancy. Chest 2001; 119: S135-44
41. Lockshin MD, Sammaritano LR. Corticosteroids during pregnancy. Scand J Rheumatol (Suppl) 1998;107:136-8
42. Galarza-Maldonado C, Cervera R, Urgilez H. Síndrome antifosfolípidico: ventiún años después. Rev Colomb Reumatol 2004;11:48-54
43. Branch DW, Khamastha MA. Antiphospholipid syndrome: Obstetric diagnosis, management and controversies. Obst Gynecol 2003; 101: 1333-44
44. Lockshin MD, Druzin ML, Qamar T. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody. Am J Obstet Gynecol 1989;160:439-43
45. Tincani A, Branch W, Levy RA, et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. Lupus 2003;12:524-9

24

SÍNDROME DE SJÖGREN

Juan-Manuel Anaya
Patricia Vega
Paula A. Correa
Yoon Jeoung Kwon
Mónica Brito
Cecilia Alliende
María-Julieta González



*El síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatía autoinmune caracterizada por la resequedad de mucosas, principalmente oral y lacrimal, producto de un infiltrado linfocitario progresivo y benigno. Afecta principalmente a mujeres durante la cuarta y quinta década de la vida. Puede presentarse como entidad única (SS primario) o acompañar a cualquier enfermedad autoinmune (SS secundario). La etiología es desconocida aunque distintos factores han sido involucrados, entre ellos factores genéticos, inmunológicos, infecciosos y hormonales. En el presente capítulo se analizan estos factores y los mecanismos que participan en la patogénesis de la enfermedad, incluyendo el patrón de citoquinas predominante y su desbalance, las moléculas de adhesión, la función del oxido nítrico, la redistribución de aquaporinas, la sobreexpresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular y el desbalance con los inhibidores tisulares de éstas, la desorganización molecular y estructural del polo apical de células acinares, entre otros. El haplotipo HLA-DRB1*0301 DQA1*0501 DQB1*0201 se asocia con la enfermedad; sin embargo, esta asociación no es específica. Otros genes No-HLA son candidatos para conferir susceptibilidad y/o protección. El tratamiento actual está encaminado al manejo de los síntomas secos y sistémicos, según cada caso. Sin embargo, nuevas terapias específicas están siendo desarrolladas y utilizadas.*

Contenido

Definición
Manifestaciones clínicas
Diagnóstico
Fisiopatología
- Linfocitos T y B – anticuerpos
- Citoquinas
- Moléculas de adhesión
- Apoptosis
- Óxido nítrico
- Flujo glandular
- Origen y desarrollo de la exocrinopatía

Inmunogenética
Tratamiento
Comorbilidad

Introduccion

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica, autoinmune, caracterizada por la resequedad de mucosas, principalmente oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmía), debido a la disminución o ausencia de secreciones glandulares (1). La hiposecreción glandular es el resultado de varios mecanismos: interacción celular (infiltrado linfoplasmocítico), humoral (autoanticuerpos y mediadores inflamatorios solubles) y alteraciones en la comunicación matriz extracelular-célula acinar (acción proteolítica y cambios en la arquitectura secretora de la célula acinar). El carácter autoinmune de la enfermedad está dado por la presencia de autoanticuerpos, algunos de ellos con propiedades patogénicas probadas, por la ausencia de un agente etiológico conocido, y por las características histopatológicas. En efecto, para caracterizar un paciente con SS se debe confirmar el carácter inflamatorio de la resequedad mediante el análisis histopatológico de las glándulas salivares, en donde, necesariamente se observa un infiltrado linfoplasmocítico benigno, focal, periductal y difuso en una magnitud importante, en la mayoría de los acinos examinados. Esta inflamación puede ser responsable del aumento del volumen de las glándulas salivares (parótidas y submaxilares) y, con menos frecuencia, de las glándulas lacrimales. El análisis de las alteraciones de las glándulas salivares de los pacientes SS ha estado centrado, históricamente, en el infiltrado linfoplasmocítico; sin embargo, cambios importantes en la calidad del parénqima glandular remanente ocurren con frecuencia, tales como: cambios en la polaridad nuclear, dilatación de los lúmenes acinares, desorganización morfomolecular del polo apicobasal de la célula acinar, fusión y sobreacumulación de gránulos de secreción, presencia de haces de colágeno estromales entre células acinares y en el lumen de los acinos, desorganización de la lámina basal y desanclaje completo de las células acinares a su lámina basal (anoikis) y presencia de restos celulares en el lumen de conductos (Figura 1), entre otros (2, 3).

Inicialmente definido como una exocrinopatía autoinmune (4), el SS es considerado actualmente como una epitelitis autoinmune, dado que el epitelio de las glándulas exocrinas parece ser el blanco de la respuesta inflamatoria (5). Por esta razón, prácticamente todas las glándulas exocrinas se pueden ver afectadas en un paciente con SS. La respuesta inflamatoria local es el origen de mediadores solubles que, una vez en la circulación, son responsables de los síntomas y signos extraglandulares o no-exocrinos. El SS es, por lo tanto, una enfermedad sistémica, con importante repercusión sobre el estado físico, psicológico y social (Tabla 1).

El SS se considera como el segundo desorden reumático autoinmune más común después de la Artritis Reumatoide (AR), con una prevalencia en la población adulta estimada entre el 1% y 3% (6,7). El subdiagnóstico de esta enfermedad es frecuente, y la magnitud de su prevalencia resalta la necesidad de investigar más los mecanismos etiopatogénicos.

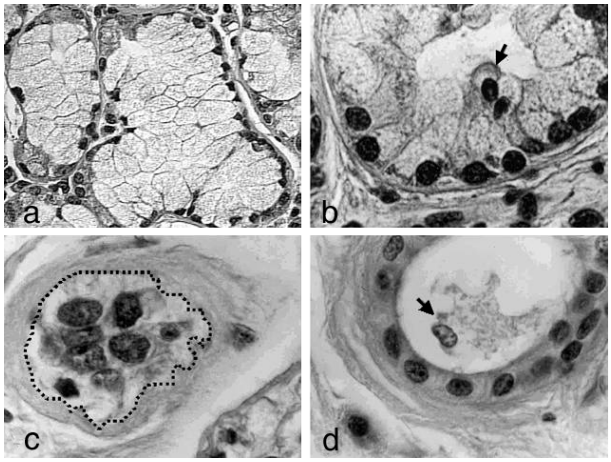


Figura 1.
Consecuencias morfológicas del daño de la lámina basal de acinos de glándula salivar labial (GSL) de pacientes con síndrome de Sjögren.
a. En esta microfotografía se observan dos acinos seromucosos de una sección de GSL de un individuo control, las células acinares mantienen la polaridad celular, con sus núcleos basales y los componentes de secreción en el polo apical, lúmenes muy estrechos. b - d. Secciones de GSL de un paciente con SS. b. Acino con lumen dilatado y la fecha señala dos células que han perdido polaridad y anclaje a la lámina basal. c. Se observa desanclaje masivo de las células de un acino de su lámina basal, d. Presencia de restos celulares en el lúmen de un ducto, las características del núcleo son similares a las observadas en c. Modificado de ref. 2.

Tabla 1. **Importancia del síndrome de Sjögren.**

1.	Alta prevalencia (~2% de la población adulta)
2.	Es una enfermedad sistémica
3.	Afecta considerablemente la calidad de vida
4.	Su diagnóstico es subestimado
5.	Tiene tratamiento (multidisciplinario)

Manifestaciones clínicas

Síntomas por compromiso exocrino

Xeroftalmía

Las personas que tienen xeroftalmía sienten irritación, quemazón y tienen la sensación de arena en los ojos; los párpados pueden adherirse entre sí. La xeroftalmía es un problema relativamente común y poco diagnosticado que puede ser el resultado de varias condiciones tales como la edad y el uso de ciertos medicamentos (Tabla 2). Aunque la xeroftalmía se observa con más frecuencia en las personas de edad, personas jóvenes también pueden tener este síntoma. Es importante recordar que tener el ojo seco no es normal, y que cerca del 60% de las personas que consultan al oftalmólogo por ojo seco sufren de SS.

Xerostomía

El componente oral del SS está caracterizado por una sensación de sequedad acompañada de sed y dificultad para masticar (8).

Tabla 2. Diagnóstico diferencial del compromiso oral y ocular del SS.

Parotidomegalia	Xerostomía	Xeroftalmía
Infecciosa	Sialoadenitis crónica	Medicamentosa
Viral	Medicamentosa	Enfermedades oculares
Paperas	Atropína y similares	Conjuntivitis crónica
Influenza	Betabloqueadores	Dermatitis bulosa
Virus de Epstein-Barr	Etanercept	Blefaritis crónica
Cocksackie	Antihistamínicos	Fibromialgia
Cytomegalovirus	Fibromialgia	Xeroftalmía senil
VIH	Deshidratación	Neurológica
Bacteriana*	Infecciosa	Compromiso del V y VII pares
Streptococcus	Xerostomía senil	Enfermedad del Injerto contra el huésped
Staphylococcus	Respiración oral	Fibrosis quística
Micótica	Neurológica	Viral
Histoplasmosis	Esclerosis múltiple	Metabólica
Actinomicosis	Parkinson	Hipovitaminosis A
Tuberculosis	Depresión	Diabetes
Sarcoidosis	Post-radioterapia	Adicción al computador
Amilosis	Congénita	
Metabólica/Endocrina	Aplasia de glándulas salivares	
Dislipidemia		
Pancreatitis crónica		
Cirrosis hepática		
Diabetes melitus		
Acromegalia		
Desnutrición		
Hipovitaminosis (A,B6,C)		
Parotiditis recurrente del niño*		
Tumoral		
Tumor mixto*		
Linfoma		
Leucemia linfoide crónica		

* Generalmente unilateral.

Además de la xerostomía y xeroftalmía, los pacientes con SS pueden presentar otros síntomas secos como xerodermia (piel seca), xeromicteria (sequedad de la mucosa nasal), etc, (9). La función de las glándulas de los órganos internos también puede verse afectada en la evolución de esta enfermedad; es así como, el compromiso pulmonar, digestivo o renal no son otra cosa que la extensión de la misma enfermedad.

Síntomas por compromiso no exocrino

El compromiso articular, cutáneo inflamatorio, hematológico, tiroideo, vascular y del sistema nervioso es consecuencia de la intensidad del estado inflamatorio de la enfermedad, del estímulo y activación de linfocitos B, del infiltrado linfoplasmocitario local y de su repercusión sistémica mediada por autoanticuerpos y otros mediadores solubles (citoquinas, óxido nítrico, hormonas).

Hasta el 10% de los pacientes con SS pueden desarrollar linfoma de células B, en especial tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) de bajo grado (10). De manera característica, estos pacientes presentan una hipergammaglobulinemia y se ha encontrado que niveles disminuidos de C4 y la presencia de púrpura palpable en el momento del diagnóstico, son hallazgos frecuentes que sugieren esta complicación (11).

Síndrome de Sjögren primario vs secundario

El SS puede observarse asociado a otra enfermedad autoinmune, en particular a la AR y a la tiroiditis de Hashimoto (SS secundario); o presentarse aisladamente como entidad única (SS primario). Aunque estas dos formas diferentes presentan síntomas secos, pueden asociar distintos signos y síntomas sistémicos.

SS primario

Los pacientes con SS primario (SSp) padecen más severamente el compromiso ocular y oral, y pueden presentar autoanticuerpos sin desarrollar ninguna otra enfermedad. Los síntomas de compromiso de otras mucosas son más importantes en el SSp que en el secundario. La parotidomegalia es más frecuente en la presentación primaria que en la secundaria.

El SSp afecta especialmente a la mujer, entre la cuarta y quinta década de la vida; pero puede observarse en niños (SS juvenil) (12) y en hombres (13,14), con similares características clínicas. La principal forma de presentación del SSp en adultos es con síntomas secos, mientras la parotidomegalia es la forma de presentación más frecuente del SSp juvenil. El SSp tiene una presentación y curso similar en todo el mundo. Factores tales como la etnia y la situación geográfica no afectan su expresión clínica.

SS secundario

Significa que el paciente presenta SS y otra enfermedad autoinmune. Entre las enfermedades más encontradas en los pacientes con SS secundario está la AR y la tiroiditis de Hashimoto. Es importante señalar, que el principal síntoma articular del SSp es la artralgia inflamatoria. La artritis, menos frecuente, suele ser intermitente, y compromete articulaciones de manos y rodillas principalmente. Una sinovitis persistente de metacarpofalángicas en un paciente con SSp sugiere una AR. Por lo general, el SS que acompaña a la AR es de aparición posterior y tardía a la artritis (varios años). No obstante, en niños y en algunos adultos, la AR puede manifestarse en principio como SS. De otra parte, debe recordarse que no todo paciente con AR y síntomas secos tiene SS (Tabla 2).

Además de la AR puede este síndrome asociarse con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) o con Esclerosis Sistémica (ES). Debe recordarse que tanto el factor reumatoide (FR) como los anticuerpos antinucleares (AAN) pueden estar presentes en estas enfermedades, y que también pueden ser positivos en el SSp. Aunque la presentación del SSp en pacientes mayores de 70 años es similar a la presentación de la enfermedad en adultos menores (15), estos pacientes pueden presentar similitudes con el LES de presentación tardía. En efecto, la presencia de leucopenia, AAN positivos, artritis, fotosensibilidad y síntomas secos, puede hacer evocar ambos diagnósticos. Mientras no se conozcan las causas de estas enfermedades y no se dispongan de estudios prospectivos a largo plazo, la taxonomía de las EAI será inexacta.

Tabla 3. Utilidad de la biopsia de glándula salivar para el diagnóstico de SS.

1.	La biopsia es esencial para el diagnóstico de SS primario en pacientes que no presenten claros síntomas secos, o en quienes se sospeche SS primario y no se detecten autoanticuerpos.
2.	El puntaje por focos es el número de células mononucleares (en su mayoría linfocitos) que se observan en un campo de 4 mm^2. Un "foco" de 1 equivale a 50 células/ 4mm^2. Un puntaje de 2 a 100, y así sucesivamente hasta 10. Cuando el infiltrado ocupa la totalidad del campo, equivale a un puntaje de 12. El puntaje por focos es una medición semicuantitativa de severidad de la SAF, sin ser por si solo diagnóstico. Los resultados de la biopsia deben aplicarse al componente oral y no al síndrome completo.
3.	El diagnóstico histopatológico debe distinguir la SAF de la SAC en una muestra adecuada que contenga al menos cuatro acinos. La SAF corresponde a un infiltrado mononuclear focal con al menos un foco inflamatorio. La SAC corresponde a un infiltrado disperso e inferior a un foco. Los aspectos de SAC tales como los observados en sialoadenitis esclerosante, o en las obstrucciones glandulares no deben ser considerados parte del SS, ni su estado terminal.
4.	La biopsia puede revelar otras enfermedades que semejan clinicamente el SS (sarcoidosis, amilosis, linfoma).

SAF: sialoadenitis focal, SAC: sialoadenitis crónica, SS: síndrome de Sjögren.

Diagnóstico

Muchas de las enfermedades reumatológicas autoinmunes, tales como el LES, la AR, la ES y la Dermatomiositis (DPM), pueden compartir síntomas y signos similares y, en ocasiones, más de una enfermedad autoinmune puede coincidir en un mismo paciente (15). Por estas razones el diagnóstico del SS puede ser difícil y prestarse a confusión. Por otro lado, no todo paciente con enfermedad reumatológica, distinta al SS, que presente síntomas secos tiene SS. En la mayoría de los casos son los síntomas secos los que motivan la consulta del paciente.

Para diagnosticar el SS hay varias pruebas disponibles. Ellas incluyen un examen cuidadoso de los ojos, la medida de la producción lagrimal y de la saliva; el examen de las glándulas salivares, y la biopsia de las glándulas salivares menores para determinar la presencia del infiltrado inflamatorio. Este último examen, a nuestro juicio, es el principal criterio de diagnóstico, siempre y cuando su realización e interpretación sean adecuadas (Tabla 3). Sin embargo, un gran vacío en este examen es la falta de la evaluación cualitativa del parénquima glandular remanente. Esta deficiencia es importante considerarla en el contexto de la conducta a seguir, en la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente con SS. Este hecho es muy crítico, sobre todo para aquellos pacientes que presentan una gran xerostomía, acompañada de una alta cantidad de parénquima glandular, pero con claras alteraciones estructurales en los acinos, (Figuras 1b y c). A la fecha, el análisis de la calidad del parénquima no está en ninguno de los criterios de diagnóstico de este síndrome. Los criterios mundialmente aceptados para el diagnóstico de SS se resumen en la Tabla 4 (16).

La mayoría (85%) de los pacientes con SS presentan AAN en el suero, siendo los patrones homogéneo y moteado los más observados (17,18). También se observa FR en cerca del 50% de los pacientes (independiente de las manifestaciones articulares o de si se trata de un SS secundario a la AR). Los pacientes con sospecha de SS que presenten AAN deben ser investigados para anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B. Así mismo se debe solicitar el análisis de anticuerpos anti-DNA nativo y anti-Sm. Estos dos últimos autoanticuerpos están ausentes en el SS y son característicos del LES.

La prevalencia de los anticuerpos anti-Ro en sueros de pacientes con SS primario varía entre el 40 y 80%, y la presencia de los anticuerpos anti-La varía entre el 30 y 60 %. Estos rangos en la seroprevalencia se deben a los diferentes métodos usados para detectar dichos anticuerpos. Los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) ofrecen una buena ayuda diagnóstica dada su alta sensibilidad y especificidad. Si bien la presencia de anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B son de ayuda diagnóstica, los niveles de éstos no varían significativamente durante el curso de la enfermedad, por lo tanto su determinación repetida no es necesaria en el seguimiento clínico (18,19).

La presencia de anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B se ha asociado con inicio temprano de la enferme-

Tabla 4. Criterios para la clasificación del SS.

I. Síntomas oculares	
Definición:	Respuesta positiva a al menos una de las siguientes: 1. Ha tenido usted diariamente, persistentemente, la molestia de ojos secos durante más de 3 meses? 2. Tiene usted la sensación recurrente de arena en los ojos? 3. Usa usted lágrimas artificiales más de tres veces al día?
II. Síntomas orales	
Definición:	Respuesta positiva a al menos una de las siguientes: 1. Ha tenido usted diariamente la sensación de boca seca durante más de 3 meses? 2. Ha tenido usted persistentemente o recurrentemente aumento del tamaño de las glándulas salivares? 3. Toma usted frecuentemente líquidos para facilitar la deglución de alimentos sólidos?
III. Signos oculares	
Definición:	Evidencia objetiva de compromiso ocular, determinada por el resultado positivo de al menos una de las siguientes 2 pruebas: 1. Prueba de Schirmer (< 5mm in 5 minutos). 2. Prueba de Rosa de Bengala (> 4).
IV. Características histopatológicas	
Definición:	Puntaje por focos >1 en la biopsia de glándulas salivares accesorias, obtenida a través de una mucosa de apariencia normal, demostrando siaoadenitis linfocítica local (ver Tabla 3).
V. Compromiso de glándulas salivares	
Definición:	Evidencia objetiva de compromiso salivar, determinada por el resultado positivo de al menos 1 de las siguientes 3 pruebas: 1. Gamagrafía salivar (hipocaptación). 2. Sialografía de parótida, que demuestra la presencia de sialectasias difusas sin evidencia de obstrucción en los ductos mayores. 3. Flujo salivar sin estímulo disminuido (< 1.5ml in 15 minutos).
VI. Autoanticuerpos	
Definición:	Presencia, en suero de: 1. Anticuerpos anti-Ro/SSA o anti- La/SSB, o ambos.

SS primario: En pacientes sin ninguna enfermedad potencialmente asociada, el SS primario puede ser definido así: a) Presencia de 4 de los 6 criterios, sin importar el criterio, si uno de los criterios positivos es la histopatología (IV) o serología (VI), b) Presencia de 3 de los 4 criterios objetivos (que corresponden a numerales III, IV, V y VI.
SS secundario: En pacientes con una enfermedad potencialmente asociada (por ejemplo, una enfermedad autoinmune bien definida), la presencia del numeral I o II de los criterios de clasificación más dos positivos entre los numerales III, IV y V, debe ser considerado como indicativo de SS secundario.
Criterios de exclusión: pos tratamiento con radioterapia en cabeza y cuello, infección por Virus de la Hepatitis C, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Linfoma pre-existente, Sarcoidosis, enfermedad injerto contra huésped, uso de fármacos anticolinérgicos.

dad, mayor duración, mayor frecuencia de manifestaciones extraglandulares y mayor infiltración linfocitaria en las glándulas salivares (20).

Diagnóstico diferencial

Un factor importante de considerar es que no todo paciente con síntomas secos sufre de SS. En la Tabla 2 están resumidas otras causas de síntomas secos y de parotidomegalia, que deben ser consideradas dentro del diagnóstico diferencial de SS.

Fisiopatología

El origen de las EAI es incierto y por tanto la etiología del SS no es la excepción. No obstante, factores inmunológicos, genéticos, psicoendocrinos e infecciosos pueden contribuir en el desarrollo de estas enfermedades.

Entre los agentes infecciosos asociados con la patogénesis del SSp ciertos virus han atraído la atención de los investigadores, en especial, aquellos con características sialotrópicas o linfotrópicas, como el virus Epstein Barr (EBV), el virus de la hepatitis C (HVC), retrovirus y, más recientemente, cocksackie virus (22). Sin embargo, su papel etiopatogénico no es claro.

Linfocitos T y B – anticuerpos

Análisis de los infiltrados linfocíticos provenientes de glándulas salivares de pacientes con SS primario, han mostrado predominancia de linfocitos T CD4, seguido de linfocitos T CD8, linfocitos B y macrófagos (23). Los macrófagos, monocitos, y células naturales asesinas (NK), están pobremente representados en la lesión, constituyendo cerca de un 5% del total de células infiltrantes (24). Los linfocitos B están ubicados alrededor de los conductos, y alrededor de éstos se halla los linfocitos T (25). La proporción de células CD4 a CD8 es > 2.

Aproximadamente un 80% de los linfocitos en la lesión salivar expresan el marcador celular CD45RO (fenotipo inductor/memoria) (25). La relación entre células CD45RO y CD45RA es cercana a 2. Lo anterior indica que los linfocitos CD4 están activados en la lesión y juegan un papel clave en la progresión de la enfermedad a través de la activación de células B (25), responsables de la producción de autoanticuerpos.

La producción de autoanticuerpos es una característica esencial de la mayoría de las enfermedades autoinmunes (EAI). Estos autoanticuerpos son el resultado de la disfunción de los linfocitos B, asociada entre otros facto-

res (reacción cruzada, liberación de antígenos crípticos, etc), con una alteración en la recombinación en los genes de la región variable de las inmunoglobulinas (26). Se ha observado que la diferenciación anormal de los linfocitos B ocasiona una disminución en el porcentaje de células B de memoria y un aumento en los niveles de CD27 soluble que además, se correlaciona con los niveles de IgG sérica (27). La respuesta inmune inflamatoria crónica y la neogénesis de tejido linfoide que se observa en los pacientes con SS se han postulado como causas importantes para el desarrollo de linfomas de células B (28), hallazgo más frecuente en estos pacientes que en la población general (29). Se ha encontrado que los pacientes con SS y linfoma tienen un aumento en el número de las células B CD27+ en comparación con los pacientes sin linfoma y se postula que el control de los niveles de las células B CD27+ podría servir como marcador de seguimiento, para evaluar el riesgo de linfoma en pacientes con SS (30).

Entre los autoanticuerpos más encontrados en los pacientes con SS están los anticuerpos contra los antígenos de las ribonucleoproteínas Ro/SSA, y La/SSB, contra la α-fodrina (31), contra los receptores muscarínicos (32-34) y contra el CD4 (35), entre otros (Tabla 5).

Los anticuerpos anti-Ro se unen a dos proteínas relacionadas entre sí, de un peso molecular de 60 y 52 kD unidas al ácido ribonucléico (RNA) en el citoplasma humano. La función biológica de las proteínas Ro es desconocida. Los anticuerpos anti-La reconocen una fosfoproteína nuclear de 47 kD, que funciona como factor auxiliar en la fase terminal de la transcripción, induciendo cambios conformacionales en la RNA polimerasa III (36). La α-fodrina es parte del componente citoesquelético de varias células eucarióticas, y está conformada por dos cadenas heterodiméricas; es una proteína de unión a la actina y tiene sitios de unión a varias proteínas. La presencia de autoanticuerpos contra estos antígenos endógenos podría

TABLA 5. Principales autoanticuerpos en el SSp.

Anticuerpos no-órganoespecíficos	Asociación clínica	Asociación inmunológica
Ac. contra componentes del núcleo		
Antinucleares	Bx +	Ro,La
Anti-DNA	Evolución a LES	
Ac. Antirribonucleoproteínas		
Anti-Ro/SS-A	Cutánea, Muscular Bloq. Cardíaco	AAN, FR, La
Anti-La/SS-B	Articular, Cutánea Parotidomegalia	AAN, FR, Ro
Anti-Sm	Evolución a LES	—
Anti-RNP	Evolución a LES?	—
Anticentrómero	Evolución a ES?	—
Ac. contra componentes del citoplasma		
Anticitoplasma de neutrófilo	Cutánea, SNP, Raynaud	—
Ac. contra organelas citoplasmáticas		
Antimitocondriales	CBP	—
Anti-complejo de Golgi	—	—
Ac. contra componentes de las membranas celulares		
Antifosfolipídicos	SAF?	—
Anti-célula endotelial	Raynaud?	—
Anti-neutrófilo	Articular, Raynaud, Pulmonar	—
Anticuerpos contra componentes circulantes en suero		
Factor reumatoide	Cutánea	Ro, La, Criog
Anti-CCP	—	—
Crioglobulinas	Cutánea, VHC, Linfoma	HipoC
Anticuerpos organoespecíficos		
Anti-célula parietal gástrica	Tiroiditis?	—
Anti-microsomas hepáticos/renales	—	—
Antipancreáticos	—	—
Antitiroideos	Tiroiditis	—
Anti-músculo liso	Hepatopatía?	—
α-fodrina	Controversial	—
Anti-M3	Disfunción autonómica? Síntomas secos?	Ro, La
Antineuronales	—	—

SAL: sialoadenitis linfocítica. BCNC: bloqueo cardíaco neonatal congénito. LES: lupus eritematoso sistémico. AAN: anticuerpos antinucleares. ESCL: escleroderma. SNP: sistema nervioso periférico. CBP: cirrosis biliar primaria. SAF: síndrome antifosfolipídico (raro). VHC: virus de la hepatitis C

Tabla 6. Mecanismos de generación de autoanticuerpos.

- Alteración incidental del producto de un gen (ej. p53, Ro)
- Mimetismo molecular
- Agentes del medio ambiente, toxinas. Generación de epítopes crípticos
- Pérdida de la tolerancia. Propagación del epítope
- Apoptosis. Antígeno persistente. Neoepítopes

ser consecuencia de la liberación de éstos al medio externo por la destrucción celular como resultado de la respuesta inmune, o alternativamente podría ser explicado por un procesamiento alterado del mRNA de estas proteínas como ha sido demostrado para La/SSB (37) y se sugiere para CD4, en cuyo caso serían presentadas a través del MHC, activando células T autoinmunes (Tabla 6).

Quizás los anticuerpos contra Ro/SSA, La/SSB y α-fodrina no tengan mayor relevancia fisiopatológica en la progresión de la enfermedad exocrina; no obstante, los primeros han sido asociados con varias de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. A diferencia de éstos, los anticuerpos IgG detectados en sueros de pacientes con SS contra los receptores muscarínicos tendrían un profundo impacto en la pérdida del flujo salivar como resultado de la desensibilización de los receptores a sus agonistas (32-34,38). Estudios realizados en el ratón diabético no-obeso (NOD) y en el NOD.Igmnull, han demostrado que la pérdida de la función secretora es dependiente de la presencia de linfocitos B productores de autoanticuerpos, probablemente dirigidos contra receptores colinérgicos / muscarínicos y α-adrenérgicos, los cuales podrían actuar a través de un proceso de desensibilización mediado por una estimulación crónica, o impedimento estérico hacia los agonistas, impidiendo su unión con el receptor (39) (Figura 2). También se ha planteado que los autoanticuerpos contra los receptores muscarínicos, en especial M3 (M3R), podrían asociarse a la disfunción autonómica que se observa en algunos pacientes con SS (40)

Aunque el significado de los anticuerpos contra CD4 no está bien establecido, se ha reportado que un bajo porcentaje de pacientes con SS (5.4%) exhibe linfopenia T CD4 en sangre periférica en ausencia de infección serológica por HIV (35).

Citoquinas

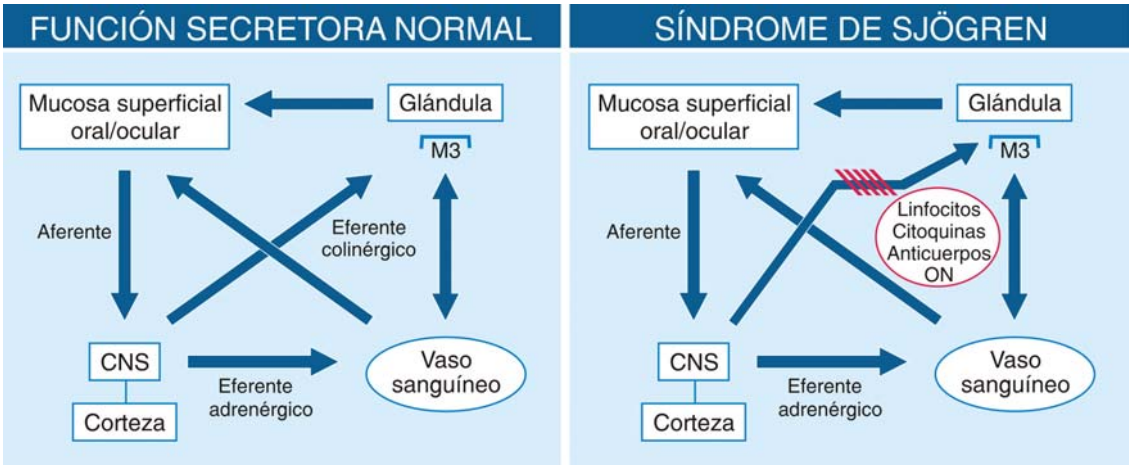
En biopsias de glándulas salivares en SS se ha detectado IL-1α, IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ, y TNF-α, tanto a nivel del RNA mensajero (mRNA), como de la proteína (Tabla 7). Los niveles reportados para estas citoquinas han sido mucho mayores que en controles normales. INF-γ, IL-2 e IL-10 son secretados por células T CD4, mientras las células epiteliales secretan IL-1α, IL-6, y TNFα, sugiriendo una participación importante de éstas en la patogénesis (41). Los resultados anteriores, en conjunto con la no detección de IL-4 e IL-5 en células CD4 en el mismo estudio, sugieren que las células Th1 tendrían un papel crucial en la destrucción de los acinos glandulares, aunque no se descarta la participación de Th2 en etapas

Tabla 7. Citoquinas examinadas en glándulas salivares de pacientes con SS.

Citoquina	Linfocitos	Acinos	Canalículos
IL-1	±	+	++
IL-2	+	-	-
IL-4	±	-	-
IL-5	±	-	-
IL-6	+	++	-
IL-10	+++	-	-
IL-12	+	+/-	++
TGF-β	+	+	+
IFN-α	-	++	+
IFN-β	±	+	±
IFN-γ	++	±	++
TNF-α	++	+++	-

Los resultados son mostrados en valores de negativo (-) a fuertemente positivo (+++).

Figura 2.
Función secretora en el Síndrome de Sjögren.
ON: óxido nítrico.



tempranas de SS. Mitsias DI et al (42) describieron la expresión de citoquinas Th1/Th2 a nivel tanto de mRNA como de proteínas en glándulas salivares de pacientes con SS; de una manera significativa en comparación con controles el IFN-γ y la IL-13 se expresaron en mayor cantidad en los pacientes, y encontraron que estos niveles se correlacionaban con el grado de infiltración glandular.

La producción de IFN-γ por parte de las células CD4 llevaría a un aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en las células epiteliales, convirtiendolas en células no-profesionales presentadoras de antígenos. La producción de IL-6 por parte del epitelio glandular, en conjunto con la de IL-10 e IL-2 por células CD4, induciría la proliferación y activación de las células B y la producción de autoanticuerpos (Figura 3).

Algunos reportes (23,43) han señalado la presencia de TGF-β, la cual ha sido descrita como una citoquina inmunoregulatoria, que podría atenuar el grado inflamatorio en etapas iniciales. IL-10 también tiene propiedades inmunoregulatorias al modular las funciones de células linfoides incapacitando la migración de linfocitos, células mononucleares, y células dendríticas a través de la generación de receptores decodificadores para quimoquinas (CC), en ambientes donde predominan citoquinas proinflamatorias, como medida para evitar una excesiva activación y reclutamiento de leucocitos (44). Sin embargo, en el SS, la IL-10 podría tener un papel opuesto al participar en la destrucción y pérdida de acinos glandulares (45), mediante el aumento en la expresión de ICAM en áreas donde la IL-10 es producida, teniendo como consecuencia el reclutamiento de linfocitos circulantes (46). Los efectos de la IL-10 podrían ser inmunorregulatorios solo cuando su producción es sistémica, mas no cuando es local (46). Ha sido controvertido el origen de la IL-10 y la presencia de TGF-β. Se propone que el mRNA para la IL-10 detectado en biopsias de glándulas salivares no pertenece al gen de IL-10, sino que corresponde al gen BCRF1 del virus Epstein Barr (EBV) (43), el cual comparte no solo una alta homología en secuencia sino también funcional con IL-10 (47). La expresión de TGF-β podría indicar la transactivacion del promotor de este gen por medio de la proteína p40 (tax) del virus HTLV-1.

El factor activador de las células B o BAFF (del inglés B Cell Activating Factor), que pertenece a la superfamilia del TNF, que regula específicamente la proliferación y la supervivencia de las células B, se ha demostrado en los pacientes con SS, en especial en las glándulas salivares inflamadas (48) y se correlaciona con el título de anticuerpos (49). Por lo tanto, la alteración en la sobrevida y proliferación de las células B y/o la pérdida de la tolerancia inducida por el exceso de BAFF puede ser un factor importante en el SS (50).

Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión celular son cruciales en la formación del agregado linfocitario observado en el SS, y median la adhesión a través de un mecanismo independiente de antígenos. Estas moléculas, participan en interacciones célula-célula mediante la unión a receptores de adhesión presentes en leucocitos, y son expresadas generalmente en respuesta a estímulos inflamatorios y citoquinas (IFN-γ, IL-1 y TNF-α).

Entre las moléculas de adhesión involucradas en el reclutamiento linfocítico se encuentran: la molécula de adhesión vascular-celular-1 (VCAM-1), la molécula de

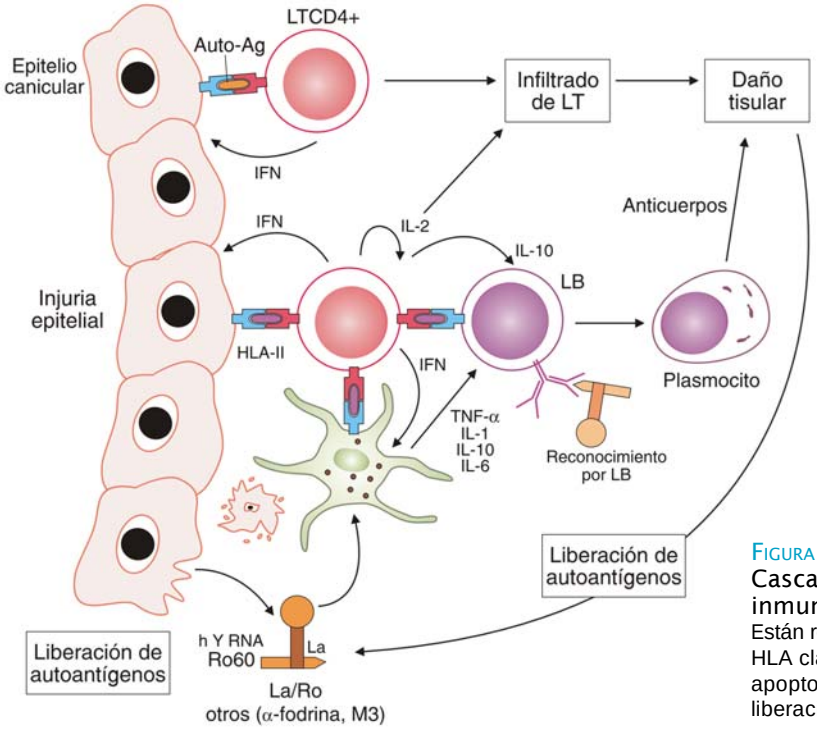


FIGURA 3.
Cascada de citoquinas y activación inmune en el síndrome de Sjögren.
Están representadas la expresión de moléculas HLA clase II por parte de la célula endotelial y la apoptosis de la misma (*), con la consecuente liberación de auto-antígenos.

adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y la molécula de adhesión endotelio-leucocito-1 (ELAM-1). Los ligandos respectivos para VCAM-1 e ICAM-1 en los linfocitos son VLA-4, y la molécula asociada a la función leucocítica-1 (LFA-1). En la lesión de SS se observa una alta expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en biopsias de glándulas salivares y lacrimales, situación que no se aprecia en controles normales o en biopsias distintas a SS. La VCAM-1 es detectada en vénulas postcapilares, e ICAM-1 en células epiteliales, fibroblastos y algunas células mononucleares. Los infiltrados consisten primordialmente en células positivas para VLA-4 y LFA-1. La expresión de CD45RO es notable en áreas donde predominan células T CD4 positivas para VLA-4. Lo anterior indica que linfocitos positivos para VLA-4 y/o LFA-1 pueden ser incorporados en las glándulas a través de VCAM-1 e ICAM-1, expresados en el endotelio en respuesta a citoquinas inflamatorias presentes (IL-1β e IFN-γ), de manera que estas vías se pueden constituir en los caminos principales para la migración de las células T a las glándulas salivares y lacrimales (51).

Apoptosis

La apoptosis está involucrada en desórdenes asociados con un incremento o disminución en la supervivencia celular. Dentro de las anomalías asociadas con un incremento en el número celular están: cáncer, EAI, infecciosas y virales; para aquellos donde la viabilidad celular está comprometida están: SIDA, enfermedades neurodegenerativas, síndromes mielodisplásicos y daño isquémico, entre otros (52).

Dos mecanismos principales han sido mostrados para la citotoxicidad mediada por células T. El primero de ellos involucra la secreción regulada y polarizada de gránulos líticos, que contienen granzimas y perforinas, las cuales son liberadas una vez ocurre el contacto entre la célula T y el blanco. El segundo involucra la interacción de Fas-ligando (FasL) de células T, con el receptor Fas presente sobre las células blanco (53). FasL no es expresado sólo por las células T, también está presente sobre otros tipos celulares y podría brindar protección inmunológica contra este tipo de células.

Evidencia de la participación de la apoptosis en el SS ha sido dada a través del modelo murino NOD/scid, en el cual se ha establecido que ocurre un proceso de alteración histológica y bioquímica, como consecuencia de una elevada actividad de cisteina-proteasas (caspasas), a pesar de un flujo normal de lágrima y saliva, y la ausencia de linfocitos T y B funcionales. Esta actividad de caspasas sugiere la activación de mecanismos apoptóticos, mediados por una predisposición genética (54).

Estudios adicionales en este modelo, en conjunto con otros modelos (NOD y BALB/c) han mostrado que FasL es constitutivamente expresado en glándulas lacrimales, submandibulares y de parótida en diferentes estadíos de la enfermedad (8 y 18 semanas). La expresión de Fas se presenta en células epiteliales y ductuales a las 18 semanas de edad únicamente en NOD y NOD/scid. Lo anterior podría indicar que un factor en el trasfondo genético de NOD induciría la expresión de Fas con la edad, el cual de una manera paracrina o autocrina, podría actuar con FasL activando la apoptosis en ausencia de linfocitos (NOD/scid), aunque si bien éstos serían necesarios para una pérdida de la función secretoria (55).

La expresión de FasL sobre células T CD4 podría ser responsable de la pérdida del epitelio glandular, al ser aumentada por la presencia local de IL-10 (45), al actuar sobre acinos y ductos positivos para Fas.

Se ha propuesto que las células acinares y ductales de las glándulas salivares de pacientes con SS mueren por apoptosis, y que éstas, como en el modelo NOD, expresan de manera anormal Fas y FasL; aunque se reporta que una gran mayoría del infiltrado mononuclear expresa Fas y la presencia de FasL es reducida (56). No se descarta que la expresión de FasL sobre linfocitos citotóxicos inducidos por citoquinas pueda tener un papel en la destrucción. Estudios recientes han confirmado que la apoptosis que ocurre en el SS es dependiente de Fas y FasL (57).

El gen Fas es altamente polimórfico (58); sin embargo, la mayoría de sus polimorfismos son no sinónimos. Por lo tanto, a pesar de que se haya reportado alguna influencia del gen Fas en el SS (59) su repercusión en la patogénesis de la enfermedad no es clara.

El análisis de la expresión de la familia Bcl-2 ha demostrado la presencia de Bcl-2 en células mononucleares infiltrantes y en conductos, aunque si bien en estos últimos la intensidad es menor comparado con la del infiltrado. Bax se encuentra elevada en acinos y conductos (60). En conjunto, estos resultados determinan la supervivencia de las células mononucleares en la lesión y la destrucción de las glándulas epiteliales como consecuencia de una susceptibilidad aumentada a la apoptosis. Otra proteína de la familia de Bcl-2 es Bak, que promueve la apoptosis. Se sabe que el IFN-γ sobrerregula la expresión de esta proteína en las células endoteliales y epiteliales (61,62). Por lo cual se propone, que el aumento en la expresión local de IFN-γ pueda contribuir a que Bak también participe en la apoptosis acinar y ductal.

Las interacciones CD40 y CD40L han sido destacadas como importantes eventos coestimulatorios en la regulación entre células T y B. Se ha descrito que la estimulación a través de CD40/CD40L participa en la proliferación de las células B y en la iniciación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas. En las células T esta estimulación actúa como un coestímulo para la proliferación. Nakamura et al (63), describieron que el infiltrado mononuclear en SS expresa CD40 y CD40L, y que la expresión de CD40L es menor que la de CD40. CD40 y CD40L están presentes en linfocitos T y B, y en un número reducido de células infiltrantes. Células positivas para CD40 expresan simultáneamente Bcl-2 (60), más del 50% del infiltrado mononuclear es positivo para Bcl-2. Lo anterior sugiere que la señalización a través de CD40 puede suministrar protección linfocitaria contra la apoptosis al inducir un aumento en la expresión de Bcl-2.

La unión de CD40 está asociada a la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPs), entre ellas, la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la quinasa p38. Estas proteínas quinasas están involucradas en respuestas celulares tales como proliferación, apoptosis, inflamación y morfogénesis tisular. Se ha observado que las células monucleares infiltrantes positivas para CD40 coexpresan formas activas de JNK y p38, sugiriendo que la activación de estas proteínas quinasas, a través de CD40, estaría involucrada en la activación de factores de transcripción, los cuales participarían en la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión involucradas en el SS (64).

Recientemente han sido identificados dos tipos de apoptosis celulares mediados por Fas (65). Las células tipo I requieren la activación de caspasa 8 en el complejo señalizador inductor de la apoptosis (DISC), asociado al dominio citoplasmático de Fas, formado después de la ligación de Fas. Luego de la activación de la caspasa 8 hay activación de caspasa 3. En este tipo de apoptosis, el bloqueo de la liberación de factores apoptogénicos tales como el citocromo C, mediante la expresión heteróloga de Bcl-2 y Bcl-Xl no tiene efecto inhibitorio sobre la apoptosis.

En las células tipo II, la formación de DISC está significativamente reducida y la activación de caspasa 3 está bajo el control de la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria; la apoptosis puede ser prevenida por la sobreexpresion de Bcl-2 y/o Bcl-Xl. En las células tipo II la apoptosis se iniciaría a través de la activación de caspasa 8, la cual fragmentaría Bid, cuyo resultado, la p15, sería translocado a la mitocondria, en donde, actuando sólo o en conjunto con Bcl-2 o Bcl-Xl, liberaría el citocromo C al citoplasma activando el factor inductor de la apoptosis (Apaf-1), y por consiguiente a la caspasa 9 cuyo substrato es procaspasa 3 (65).

Estudios dirigidos a establecer el tipo de muerte que ocurre en el epitelio glandular de SS han encontrado activación de la caspasa 3 y corte de PARP (una enzima involucrada en la reparación del DNA, que es substrato de la caspasa 3), mas no activación de la caspasa 9, indicando que en el SS las células epiteliales pertenecen al tipo I y que tienen una apoptosis dependiente de la caspasa 3 (66).

La apoptosis en el SS no estaría confinada a la interacción entre Fas/FasL, también participarían linfocitos T citotóxicos (CTL), tanto CD4 como CD8, dispersos en el infiltrado, que una vez activos liberarían granzima B y perforina, jugando un papel significativo en la apoptosis (67). La acción citotóxica de linfocitos T sobre las células acinares y ductales requiere de una interacción directa con la célula acinar y ductal. Los acinos y ductos están rodeados por una lámina basal que permite el libre acceso de agua, moléculas y macromoléculas, pero es una barrera para el paso de las células. En estudios recientes en glándulas salivares labiales (GSL) de pacientes con SS se observó que ambos tipos de linfocitos presentes en focos, invaden ductos cuyas láminas basales están desorganizadas o ausentes y establecen un contacto directo con las células ductales. Sólo los linfocitos T CD8 tienen el mismo comportamiento en los acinos, (Figura 5c) (68). En glándulas lacrimales de pacientes con SS, los linfocitos CD8 pero no CD4 fueron localizados alrededor de acinos. Sólo los linfocitos CD8 que expresaron la integrina aEb7 indujeron la apoptosis de las células acinares. Ambas vías, perforina/granzima B y Fas/FasL, estarían involucradas en el proceso de muerte celular programada en las glándulas lacrimales de pacientes SS (69). Además, en el liquen plano oral, la desorganización de la lámina basal también se ha encontrado asociada a la infiltración de células CD4 y CD8, y ha sido propuesto como uno de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad (70).

Mecanismos de reparación han sido encontrados en biopsias de pacientes con SS, tales como la expresión significativa de la proteína pS2 en células epiteliales y ductuales, la cual se ha asociado con mecanismos de regeneración (67). La pS2 pertenece a una familia de proteínas conocidas como Trefolinas, las cuales contienen de uno a seis dominios ricos en cisteína, y están en el citoplasma de células epiteliales gástricas e intestinales. Éstas actúan

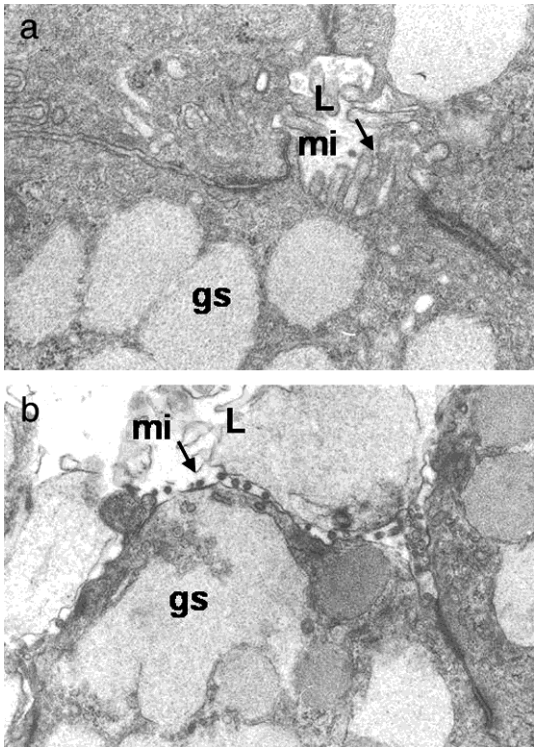


FIGURA 4.
Ultraestructura del polo apical de una célula acinar de GSL de paciente con síndrome de Sjögren.
a. Sección ultrafina de GSL de un individuo control, se observan gránulos de secreción individuales (gs), lumen acinar (L) estrecho con múltiples microvellosidades (mi) y sin contenidos, complejos de únión de aspecto normal. b. Sección ultrafina de GSL de un paciente SS, donde se observan gránulos de secreción (gs) fusionados y de forma irregular, Lúmenes (L) dilatados y con una gran cantidad de restos celulares, con imágenes de estructuras semejantes a gránulos de secreción, las microvellosidades no son observables. Adyacente a la membrana apical aparecen unas estructuras circulares que podrían corresponder a resabios de microvellosidades (flecha).
Modificado de ref. 2.

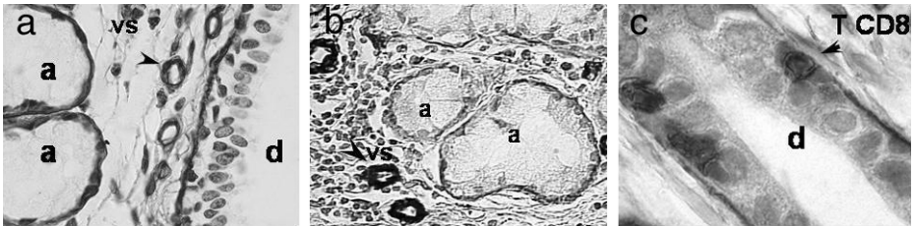


FIGURA 5.
Inmunocitoquímica de láminas basales de acinos y ductos de GSL de pacientes con síndrome de Sjögren y su asociación con infiltración de linfocitos T.
a. Sección de GSL de un individuo control que muestra una intensa inmunoreactividad de laminina en láminas basales de acinos (a), ductos (d) y vasos sanguíneos (vs). b. Sección de una GSL de un paciente SS que muestra acinos (a) cercanos a un foco linfocitario donde la inmunoreactividad se encuentra disminuida y la lámina basal con aspecto algodonoso, las láminas basales de vasos sanguíneos inmersos en el foco mantienen la inmunoreactividad de los controles. c. Sección de la GSL de un paciente SS que muestra un ducto con linfocitos T CD8 en contacto directo con células ductales, la infiltración se produce en regiones donde la lámina basal está interrumpida. Este comportamiento también lo presentan los linfocitos T CD4.
Modificado de ref. 68.

como factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, estabilizadores de mucina, y como promotores de la reparación y proliferación celular (24).

La remodelación de la lámina basal de acinos y ductos de las GSLs de pacientes es signo de que los mecanismos de reparación están actuando. Brevemente, la lámina basal está organizada por polímeros de colágeno IV y laminina (Ln) ensamblados por proteoglicanos de heparán sulfato, nidógenos 1 y 2 (Nid) y fibulinas 1 y 2. El recambio de sus componentes está regulado, en parte, por metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs). Las GSLs de los pacientes con SS presentan una pérdida de inmunoreactividad de laminina y colágeno IV y desorganización de la lámina basal de acinos y ductos, pero no de estructuras próximas (ej: vasos sanguíneos) (Figuras 4 a, b y Figuras 5 a, b). Este cambio está asociado con un desbalance en la expresión de mRNA y proteínas de MMPs/TIMPs presentes sólo en células acinares y ductales (71,72). Para evaluar si los mecanismos de reparación estaban funcionando se pusieron a prueba dos hipótesis: 1. La remodelación de láminas basales de acinos y ductos de GSLs de los pacientes con SS ocurre por un cambio en los niveles de expresión génica y de proteína de moléculas que organizan esta estructura, y 2. La desorganización de las láminas basales es consecuencia de una deficiencia de nidógeno en ellas. Los incrementos en proteína de Ln 1 y 5, demuestran que las láminas basales de los pacientes con SS presentan remodelación. Este recambio es menos evidente en pacientes que presentan signos morfológicos (fibrosis) de un estado más avanzado de la enfermedad (73). Por otra parte, el incremento en nidógeno degradado permite explicar el grado de desorganización que presentan las láminas basales de acinos y ductos de GSLs de pacientes SS, (Figura 6).

Estudios recientes, realizados en la línea celular de glándula salivar humana HSY, transfectada para Bcl-2 y Bcl-Xl, hallaron una resistencia para la apoptosis mediada por Fas, a pesar de que se observó activación de caspasa 3, disminución en la liberación de [Ca+2]i y/o disminución en el influjo de Ca+2 en respuesta a carbocolina y al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (73). Los resultados anteriores son indicativos de una apoptosis "abortiva", en la cual las células sobrevivirían al programa de muerte, pero a consecuencia de la activación de caspasas o mecanismos independientes de éstas, las células tendrían una señalización anormal que impediría la producción de secreciones salivares o lacrimales.

Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON), es un radical libre de vida media corta producto de la catálisis de la L-arginina por parte de la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS). El ON participa en la relajación del endotelio, neurotransmisión, inhibición de la agregación plaquetaria, modulación del sistema inmune, toxicidad microbicida y cancerígena, y regulación de la membrana plasmática muscular. Dentro de las NOS se distinguen dos grupos: las constitutivas y la inducible. A las constitutivas pertenecen la NOS endotelial (NOS1) y la neuronal (NOS3); la inducible (NOS2) es expresada en diferentes tipos celulares en respuesta a estímulos inmunológicos y a diferencia de las constitutivas que producen ON dentro de un rango μM (nanomolar), éstas lo sintetizan en un rango uM y no son dependientes de Ca+2 para su activación.

El ON puede actuar a través de mecanismos redox (óxido-reducción), o aditivos con proteínas que contienen tirosina, tioles (nitrosilación), agrupamientos de Fe-S, Zn-S, y hemoproteínas (75). Lo anterior pone de manifiesto al ON como un agente clave en señalización intra e intercelular al activar o inactivar participantes claves en diferentes procesos celulares (76). La nitración de proteínas que contienen tirosina por parte del peroxinitrito (ONOO-), que es un poderoso agente oxidante producido por la reacción entre el ON y el anión superóxido (O_2-), ha sido identificada como un indicador de los efectos del ON en condiciones citotóxicas, tales como enfermedades inflamatorias o neurodegenerativas (76), entre ellas el SS (77).

Un papel antiapoptótico del ON a nivel linfocitario en el SS mediante la S-nitrosilación de caspasas, se ha

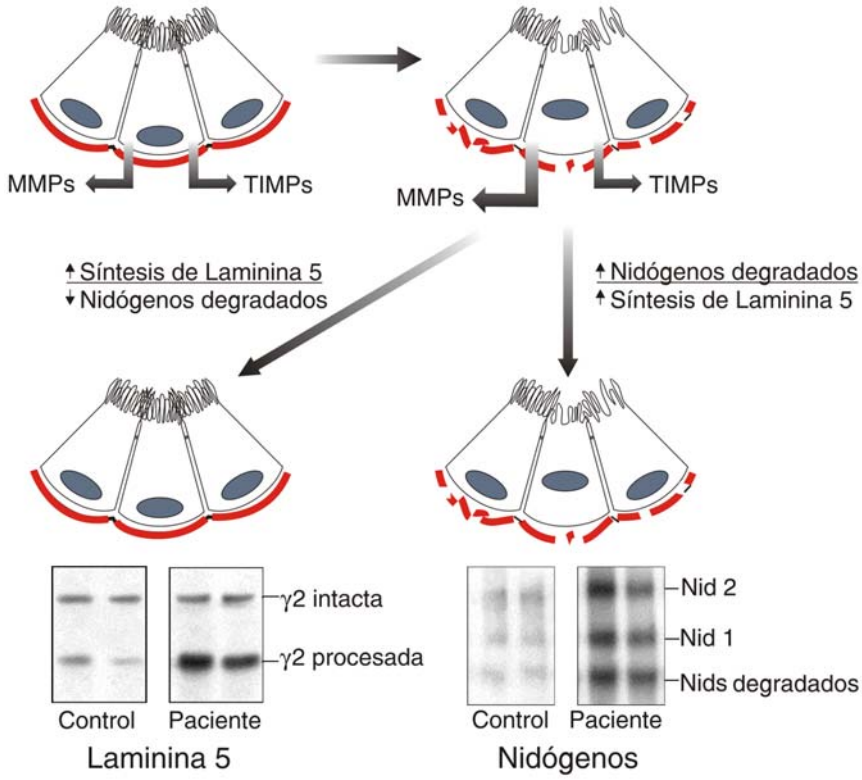


FIGURA 6.

Esquema que explica el remodelamiento de la lámina basal de acinos de glándulas salivares en pacientes con síndrome de Sögren.

El remodelamiento fisiológico de la lámina basal se produce por un balance en los niveles de expresión y actividad de las metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), esto permite mantener su organización estructural y funcional a. Por mecanismos aún no descritos, se produciría un desbalance de expresión de MMPs en relación con los TIMPs, que generaría la desorganización de la lámina basal. b. En condiciones ideales, la desorganización de esta estructura podría revertirse por aumento en los niveles de síntesis de laminina 5 y disminución en la degradación de nidógenos. c. Sin embargo, los resultados muestran que hay un incremento de la cadena γ2 procesada de laminina 5, que corresponde a la forma que se integra a la lámina basal, y un aumento de nidógeno degradado. d. Estos resultados estarían de acuerdo con los hallazgos encontrados en la detección de laminina por inmunocitoquímica, que muestran una lámina basal poco reactiva y desorganizada. La desorganización favorecería la pérdida de polaridad nuclear y anoikis. Los Western blot de ambas proteínas apoyarían esta interpretación.
Modificado de Tesis de Yoon-Jeoung Kwon (73).

reportado (77). Estos efectos también pueden explicarse mediante la protección contra la apoptosis inducida por TNF-α (78), activación de la DNA proteína-kinasa (DNA-PK) (79). La S-nitrosilación mantiene al zimógeno de la caspasa 3 en estado inactivo, y esta inactivación es revertida por la vía de activación de Fas (80). Lo anterior podría sugerir que bajo ciertas circunstancias el ON regularía la actividad de Fas, ya sea promoviendo o inhibiendo la apoptosis de acuerdo a la expresión del NOS y la concentración relativa de ON en la célula.

El ON también se ha involucrado en la patología del SS como un agente que puede contribuir al daño inflamatorio y a la atrofia acinar. Evidencia adicional indica que el ON puede tener efectos inhibitorios sobre la apoptosis linfocitaria, en particular en etapas tempranas de la enfermedad (infiltrado inflamatorio con puntajes por focos inferiores de 4) y, de esta manera, contribuye en la progresión de la exocrinopatía (77).

Un mecanismo de muerte celular poco estudiado en esta patología es la muerte celular por desanclaje de la célula epitelial a su lámina basal, "anoikis". En las glándulas salivares labiales (GLS) de pacientes con SS se encuentran con cierta frecuencia grupos de células acinares parcial o totalmente desancladas. Los núcleos de estas células no tienen las características morfológicas descritas para los núcleos apoptóticos, fragmentación nuclear, sino que se observan de apariencia normal e incluso mantienen este aspecto dentro de los lúmenes de conductos (Figuras 1b-d) (81). La desorganización de la lámina basal se produce por la degradación de proteínas que la constituyen (Figura 5 y 6). Las células acinares y ductales de GSL provenientes de pacientes con SS sobreexpresan MMP-3 y 9, ambas enzimas con especifidad para degradar laminina, colágeno IV y nidógenos, tres componentes fundamentales en la organización de láminas basales (81,82). Las células acinares a través de receptores de adhesión presentes en la membrana plasmática basal, como son las integrinas, establecen los puntos de anclajes. Las citoquinas IL-1 y TNF-α son inductoras de las MMPs, ambas citoquinas son producidas por células acinares; en consecuencia, a través de un mecanismo autocrino los acinos pueden inducir su destrucción. Este daño quizás es exacerbado

por la acción de fragmentos proteolíticos bioactivos de proteínas, como laminina, que a través de la mediación de integrinas inducen otra cascada alternativa que también activa la síntesis de MMPs (83).

En general, el equilibrio del número de células en un tejido en reposo proliferativo (quiescencia), como son las glándulas salivares, está dado por el balance entre el índice proliferativo y el índice apoptótico. Al respecto, estudios realizados con un marcador que se presenta durante todas las etapas del ciclo proliferativo, como es la proteína Ki67, determinaron que las glándulas salivares de pacientes con SS presentan marcación de células acinares y ductales. Esta marcación fue más frecuente en aquellos acinos y ductos con láminas basales desorganizadas. Las células en quiescencia (interfase, Go1) frente a un estímulo de proliferación son capaces de transitar de Go1-G1 y continuar hasta mitosis (84,85). La lámina basal se ha descrito funcionalmente como una entidad capaz de acumular factores de crecimiento y el papel acumulador lo cumplen los proteoglicanos, así una desorganización de esta estructura podría liberar estos factores y permitir que las células proliferen. Esta observación es importante porque, un grupo relevante de pacientes mantienen una cantidad importante de parénquima glandular remanente a través de los años. Si las noxas que llevan a la destrucción de las glándulas actuaran cíclica o permanentemente, lo esperado sería que, en un plazo relativamente corto de tiempo, la glándula perdiera completamente su componente epitelial. En consecuencia, este es otro indicador que los mecanismos de reparación están activos en las GSLs de pacientes con SS. Sin embargo, en algunos casos severos esta situación no llega a ocurrir y las glándulas presentan un reemplazo del epitelio glandular por tejido fibroso y adiposo (82). Un corolario sobre los estudios de apoptosis es que ellos siempre deberían estar acompañados de mediciones de marcadores de proliferación celular. Así, se lograría una visión más global de lo que está ocurriendo en las glándulas de los pacientes con SS.

Flujo glandular

La xerostomía y xeroftalmía características del SS, no pueden ser explicadas en su totalidad por la infiltración linfocitaria y la destrucción glandular, puesto que las glándulas salivares muestran una reducción que puede ir del 20% al 50% en el número de estructuras acinares (86), con lo cual el epitelio remanente debería funcionar aceptablemente. De otra parte, no hay una fuerte correlación entre el grado del infiltrado inflamatorio y la secreción glandular (87).

En pacientes con ojo seco no autoinmune hay un nivel bajo basal reducido de secreción lacrimal, pero tienen la habilidad de producir lágrimas en presencia de un estímulo. En pacientes con ojo seco autoinmune (SS) existe un nivel bajo de lagrimeo, tanto basal como al estímulo (57). Esto sugiere que existen mecanismos a nivel celular, tisular o inflamatorio que regulan la función exocrina. Entre estos mecanismos están la producción de IL-1 y TNF-α, los cuales inhiben la secreción basal y estimulada de lágrimas (88,89); la presencia de autoanticuerpos contra M3R (32-34), la alteración estructural de la célula acinar que repercute en la maquinaria molecular involucrada en la exocitosis de los gránulos de secreción (Figura 4 a y b) (81), y cambios en el patrón de diferenciación celular que modifica la calidad y/o cantidad de los productos de secreción (90,91).

Las aquaporinas (AQP), familia de canales proteicos de la membrana plasmática, trasportan agua. Han sido descritos diferentes miembros de esta familia, los cuales están presentes en diferentes tipos celulares y, de acuerdo al tipo celular, un mismo miembro puede ejecutar una misma o diferente función involucrada con el transporte de agua. La AQP5 fue clonada de glándulas submandibulares de rata, y está presente en glándula lagrimal y en pulmón, indicando su función en la generación de saliva, lágrima y secreciones pulmonares (92). La AQP5 es normalmente expresada en la membrana apical de las células acinares en glándulas salivares y lacrimales.

Ratones transgénicos deficientes para AQP5 presentan una secreción reducida de saliva, sugiriendo su relevancia fisiológica en la función glandular (93). Sería interesante analizar las posibles relaciones que existen entre la producción de autoanticuerpos contra M3R y la localización anormal de AQP5. Es posible que la quiescencia funcional observada en modelos murinos en experimentos de transferencia de autoanticuerpos anti-M3R tengan alguna conexión con la deficiencia del tráfico de AQP5 hacia la membrana plasmática apical. Esta deficiencia podría ser mediada por una desensibilización de los componentes de la señalización intracelular como consecuencia de la desensibilización causada por el bloqueo del receptor por parte del autoanticuerpo. No obstante, los cambios de polaridad celular observados en células acinares (Figura 1b), junto a la fusión y la sobreacumulación de gránulos de secreción, pérdida de microvellosidades del polo apical (Figura 7), redistribución apicobasal de MUC1 y Ezrina son indicadores de que los mecanismos de destinación y de polaridad podrían estar alterados (81). En este contexto, se podría explicar la disminución de AQP5 en la membrana plasmática apical, que se acompaña de una redistribución a la membrana plasmática basolateral y acumulación citoplasmática (94).

Se ha postulado que la mayor prevalencia del SS en mujeres podría explicarse en parte por las propiedades inmunoreguladoras de las hormonas (95,96). Estudios recientes han sugerido que las pacientes con SS son andrógeno-deficientes (97). Al parecer los andrógenos modulan la producción de lípidos en las glándulas de Meibomio en ratones y conejos. Así, la deficiencia de andrógenos podría ocasionar una secreción con alteración en el contenido de lípidos de la glándula de Meibomio, inestabilidad en la película lacrimal y mayor evaporación en el ojo seco de las pacientes con SS (98).

En acinos de GSL de pacientes con SS, la desorganización y la remodelación de la lámina basal, podría provo-

car una alteración del diálogo bidireccional célula acinar-lámina basal, llevando a una pérdida de diferenciación glandular (Figura 5). Este planteamiento hace pensar que la síntesis-procesamiento de las glicoproteínas fundamentales de la saliva podría estar alterada. Apoyando esta hipótesis se encontró, mediante un análisis microdensitométrico, que existe una disminución en la cantidad y calidad de residuos ácidos y neutros de glicoproteínas de GSL de pacientes con SS (90). Las proteínas de secreción que participan en la hidratación oral son las mucinas MUC5B y MUC7, altamente glicosiladas con monosacáridos de residuos neutros, sialiladados y sulfatados. Estos residuos confieren la propiedad de retener altas cantidades de agua que permiten la lubricación de las mucosas. En consecuencia, se evaluó si el fenotipo "seco" presente en pacientes con SS se asocia a la "capacidad hidratante" de las mucinas, determinando la expresión de las mucinas MUC 5B y MUC7 y algunas de sus modificaciones postrans-

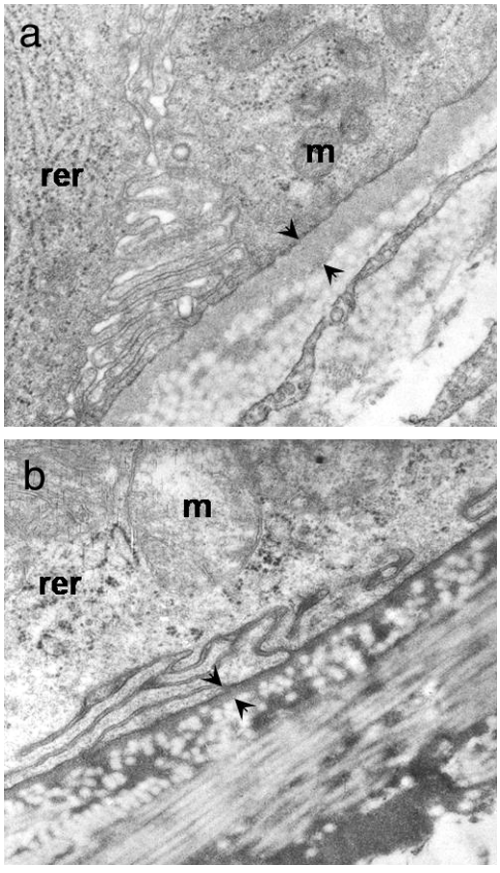


FIGURA 7.
Ultraestructura de la lámina basal de acinos de GSL de paciente con síndrome de Sjögren.
a. Sección ultrafina de GSL de un individuo control, donde se destaca las características estructurales normales de lámina basal (cabezas de flechas), note el aspecto normal de mitocondrias (m) y retículo endoplásmico rugoso (rer). b. Sección ultrafina de GSL de un paciente SS, se observa una lamina basal desorganizada, adelgazada e infiltrada con haces de fibras de colágeno estromal, se destaca una mitocondria (m) de aspecto hinchado. a y b presentan la misma magnificación.
Modificado de ref. 2.

duccionales, como es la sialilación y sulfatación de algunos oligosacáridos. En este estudio se encontró que: 1. La expresión de mRNA y de proteína de MUC5B en extractos totales de GSLs es similar entre el grupo de individuos controles y pacientes con SS; 2. En GSLs de pacientes con SS existen diferencias locales de inmunorreacción para MUC5B, observándose una sobreexpresión de esta mucina en regiones cercanas a focos de infiltrado de células mononucleares. Esto se podría explicar debido a que el promotor de MUC5B es regulado positivamente por citoquinas (99); 3. Los niveles totales y celulares del oligosacárido Sulfo Lewis a y c, presentes en MUC5B, están disminuidos en un alto número de pacientes con SS; 4. Los niveles de mRNA de MUC7 son similares en ambos grupos; sin embargo, a nivel proteico se observa un incremento detectado tanto por Western Blot como por la intensa inmunoreactividad homogéneamente distribuida en la glándula en los pacientes; 5. La identificación de oligosacáridos sialilados y sulfatados revelan que la GSL es un mosaico, con grupos de acinos reactivos y no reactivos. Más aún, dentro de un mismo acino se observa el mismo fenómeno para la sulfatación. En resumen, se puede concluir que la disminución de residuos ácidos previamente descrita (91) en pacientes SS se debería, en parte, a la baja sulfatación de MUC5B (residuos SulfoLewis a y c). La disminución en la sulfatación de MUC5B podría explicar parcialmente la sensación de boca seca que sufren los pacientes con SS.

Modelos que buscan explicar el origen y desarrollo de la exocrinopatía

Estudios en modelos animales para SS y otras EAI, así como estudios clínicos en pacientes que padecen estas enfermedades, han arrojado evidencia sobre la iniciación, desarrollo y perpetuación de la exocrinopatía.

El modelo propuesto implica tres fases. Una primera fase que es la susceptibilidad a la enfermedad. Las EAI están asociadas a un sistema complejo de interacción de genes, así como a niveles y regulación hormonal. La segunda fase es de iniciación, caracterizada por una alteración en los mecanismos de apoptosis (55). Esta fase es no inflamatoria e independiente de linfocitos. Finalmente, una tercera fase de respuesta inflamatoria, tanto celular como mediada por factores solubles, responsable de la enfermedad clínica (Figura 8).

Uno de los aspectos interesantes en la fisiología de la apoptosis es la depuración de los cuerpos apoptóticos. Proteínas tales como el componente C1q del complemento, el componente amiloide sérico P (SAP), la proteína C reactiva (PCR) y la inmunoglobulina M, entre otros, participan en la homeostasis de la apoptosis (100). De otra parte, agentes infecciosos (virales) pueden alterar la apoptosis. Es posible, por lo tanto, que en la fase de iniciación del SS la apoptosis epitelial sea favorecida por algún agente externo (toxina, virus, otro?), la depuración y homeostasis esté alterada y, en consecuencia, se genere una respuesta autoinmune inflamatoria.

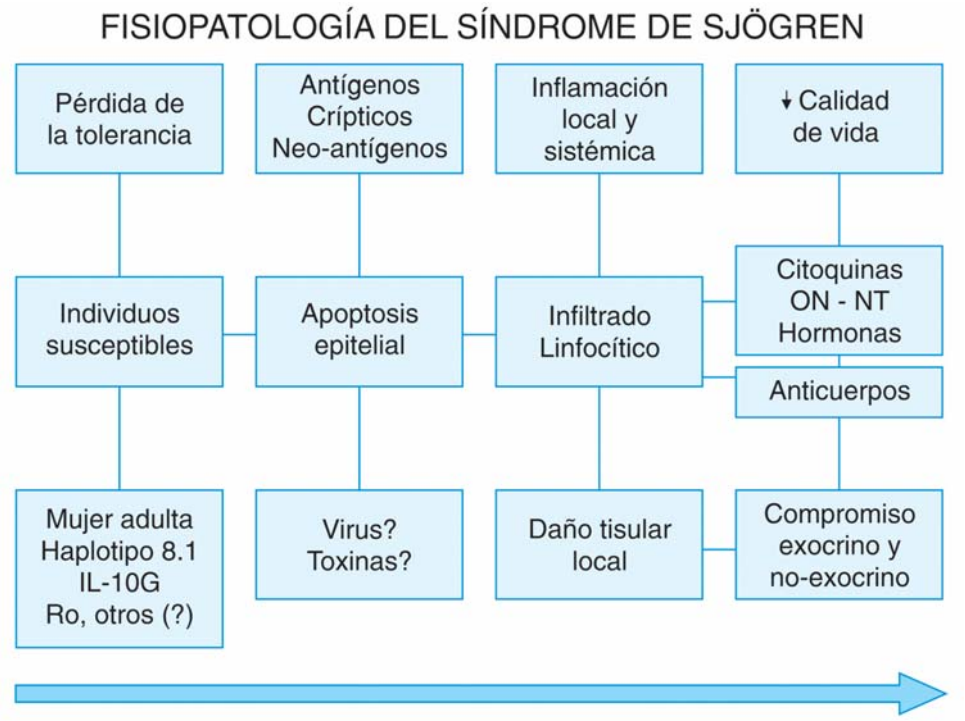


Figura 8.
Fisiopatología del SS.
En este modelo, se representa el individuo susceptible y los potenciales genes de susceptibilidad; la apoptosis epitelial y la respuesta inflamatoria, con la consecuente producción de enfermedad exocrina y no exocrina, mediada tanto por la respuesta celular linfocitaria como por factores solubles (autoanticuerpos, óxido nítrico y hormonas). Una de las características del infiltrado linfocitario es el bloqueo en la apoptosis.

Una vez considerado el fenómeno por el cual pueden ser reclutadas las células mononucleares infiltrantes, es necesario considerar los factores que regulan la tolerancia y activación de los linfocitos. Entre éstos podrían distinguirse ciertas proteínas cuya deficiencia predispone a autoinmunidad. En este grupo están Pten, p21 y CD22.

Pten es una fosfatasa cuyo substrato es el fosfatidilinositol trifosfato (PIP-3), que actúa como un segundo mensajero lipídico que, en ausencia de la actividad de Pten, lleva a un aumento de la fosforilación y activación del factor promotor de supervivencia Akt/PKB. Pten es crucial para la eliminación mediada por Fas de linfocitos activados, y linfocitos autoreactivos en la periferia (101).

p21 es un importante regulador de la proliferación del ciclo celular a través de su interacción en complejos de ciclinas/ciclinas dependientes de quinasas (CDK). p21 regula negativamente la proliferación celular de linfocitos T que han sido estimulados por largo tiempo. p21 es requerido para mantener la tolerancia hacia antígenos nucleares (102).

CD22 es una glicoproteína de membrana específica de células B que está asociada al receptor de la célula B (BCR), y es un regulador negativo de la señalización antígeno/receptor. Ha sido involucrada en la evasión de la autoinmunidad mediante la neutralización de señales en el BCR disparados por autoantígenos. Otras proteínas involucradas en la regulación de la tolerancia en linfocitos son Fas, FasL, SHP-, y PD-1 entre otras (103).

Es posible que ciertos virus puedan favorecer la apoptosis y la expresión de antígenos crípticos (p.ej. α-fodrina) (104). En resumen, no solamente una apoptosis alterada, o una depuración inapropiada de los cuerpos apoptóticos podría ser responsable para la infiltración observada en SS, también jugarían un papel importante proteínas como las mencionadas anteriormente, al tener un papel esencial en la regulación y tolerancia de linfocitos T y B.

Inmunogenética

El carácter genético del SS se demuestra desde el hallazgo de la concordancia de la enfermedad en gemelos y en distintos miembros de una misma familia (105,106). También, es frecuente observar la existencia de otras EAI en familiares de pacientes con SS y aún en el mismo paciente. La agregación familiar de las distintas EAI es una teoría actual bien definida, que apoya el papel de la genética en el desarrollo de autoinmunidad (107). El SSp es una enfermedad compleja, poligénica, es decir, varios genes participan en su predisposición y desarrollo.

HLA y SS

El SS primario en individuos caucásicos y colombianos, es una de las EAI asociadas a genes HLA-DR3 (18, 108-110). Esta asociación no ha sido observada en otros grupos étnicos (111-113). El HLA-DR3 corresponde a la especificidad determinada por serología; por análisis molecular, a ella corresponden al menos 16 subtipos, dados por variables alélicas que se dan en el gen DRB1.

La importancia del análisis de los genes del sistema HLA en EAI ha radicado no sólo en encontrar la asociación de éstos con la susceptibilidad o protección que pueden conferir a una determinada enfermedad, sino en la influencia que pueden tener en la severidad de la misma, y por lo tanto, al papel predictivo que puede tener su análisis en pacientes con diagnóstico temprano.

En la mayoría de los estudios de HLA, los alelos HLA-DRB1*0301, DRB3*0101, DQB1*0201 han sido asocia-

dos al SSp (110,113,114). La especificidad molecular DRB3*0101 corresponde a la especificidad serológica DR 52, anteriormente reportada asociada al SS primario (115); sin embargo, este alelo presenta desequilibrio de ligamiento tanto con los alelos DRB1*03 como con DRB1*11, *12, *13 y *14, estos últimos no asociados con el SS primario. Por lo tanto, su asociación a la enfermedad es de carácter secundario.

Las células epiteliales de glándulas salivares de pacientes con SS primario expresan anormalmente moléculas HLA de clase II y se comportan como células no-profesionales, presentadoras de antígeno (116). De acuerdo a la estructura cristalográfica del HLA-DR, el bolsillo 4 (P4), conformado por los aminoácidos en las posiciones 13, 70,71 y 74 de la cadena β, es crítico en la presentación antigénica (117). Los últimos tres residuos intervienen en el contacto con el receptor del linfocito T y, por lo tanto, son importantes en el reconocimiento del complejo péptido-molécula DR por parte estos linfocitos. Los alelos DRB1 han sido clasificados en 6 supertipos de patrón restrictivo ("supertype restrictive pattern", RSP) en función de la carga en las posiciones 70, 71 y 74 (118). Estos RSP pueden tener carga positiva, carga negativa, tener ambas cargas o ser neutros. El alelo DRB1*0301 tiene una carga positiva en el P4 dada principalmente por una lisina en la posición 71 y una arginina en la posición 74, y corresponde al RSP R (118). Esta clasificación funcional permite unificar diferentes resultados de asociación del HLA-DRB1 al SS primario en grupos étnicos diferentes. En efecto, los alelos DRB1 asociados al SS primario en diferentes poblaciones, tales como el *0301 en caucásicos (110,113, 114), *1101 y *1104 en judíos y griegos (119), *0405 en japoneses (112) y *0803 en chinos (112) comparten todos un residuo cargado positivamente en la posición 71, que corresponde ya sea a una lisina (*0301) o a una arginina (*1101,*1104,*0405 y *0803). Esta clasificación permite también una mejor comprensión del reconocimiento promiscuo de los linfocitos T, que pueden reconocer el mismo péptido cuando es presentado por diferentes moléculas de clase II. Los péptidos candidatos para ser presentados por el HLA-DRB1*0301 deben tener motivos de enlace hidrofóbico en la posición 1 y una carga negativa en la posición 4 del sitio de enlace de este péptido (118).

La asociación entre HLA-DRB1*0301 y SS primario no es específica, dado que se observa en otras EAI e infecciosas. El HLA-DRB1*0301 hace parte del haplotipo ancestral 8.1 (HLA-A1, Cw7, B8, C4AQ0, BfS, C4B1, DR3, DQ2) el cual se asocia con una respuesta inmune alterada, caracterizada por un aumento en la respuesta linfocitaria B, aumento en la síntesis de autoanticuerpos, disminución en la respuesta linfocitaria T, síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias (TNF-α) y alteración de la apoptosis (120). La gran mayoría de estas anomalías se observan tanto en el SS primario como en otras EAI asociadas a este haplotipo ancestral (120), siendo este un claro ejemplo del origen inmunogenético común para varias EAI.

La alineación de la secuencia de aminoácidos de la cadena DQβ de manera similar a la del DRβ permite observar que el HLA-DQB1*0201 comparte una lisina, con carga positiva, en la posición β71 igual a la de la posición β71 del HLA-DRB1*0301. Por lo tanto, este residuo parece crítico en el SSp.

Otros estudios han señalado que otros genes HLA-DQ pueden predisponer a la enfermedad (119), aun en aquellas poblaciones en donde el SSp es independiente del DRB1*0301 (113,119). En poblaciones caucásica, judía y griega, la enfermedad se asoció al DQA*0501 (113, 119), el cual ha sido reportado estar en desequilibrio de ligamiento con el DQB1*0201. Los genes DQ podrían participar también en la síntesis de autoanticuerpos. Los alelos HLA-DQ que poseen una glutamina en la posición 34 de la cadena DQα1 y una leucina en la posición 26 de la cadena DQβ1 fueron asociados con la síntesis de anticuerpos anti–Ro y anti-La (121). Kerttula T et al. (122) encontraron en población finlandesa con SS la asociación entre alelos HLA-DRB1*0301, DQA1*0501 y DQB1* 0201 y altos niveles de anticuerpos anti-Ro y anti-La en comparación con pacientes sin estos alelos. En la población japonesa el HLA-DQB1*0601 se asoció con la síntesis de anticuerpos anti-Ro (112); y en la población caucásica se reportó que la producción de anticuerpos anti-Ro y anti-La se asoció al DRB1*03-DQB1*02-DQA1*0501 como componentes del haplotipo extendido (123).

La asociación del SS con los genes HLA clase I es imprecisa. Inicialmente se sugirió relación con el HLA-B8 (124,125). Loiseau et al (126) reportaron una asociación significativa del SS al HLA-A24 en comparación con individuos control. Pero todos estos haplotipos están en desequilibrio de ligamiento, por lo cual es difícil establecer si específicamente estos genes confieren riesgo para esta enfermedad.

HLA y severidad del SSp

La fracción etiológica del haplotipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 es cercana al 20% (18), confirmando el carácter multifactorial del SSp. No obstante, el HLA, dado su carácter funcional descrito anteriormente, participa en la regulación de la respuesta inmune y se asocia con la progresión de la enfermedad y la síntesis de autoanticuerpos.

Citoquinas

Entre las citoquinas que participan en la fisiopatología del SSp, la IL-10 juega un papel crítico (Tabla 7). El gen de la IL-10 está localizado en el cromosoma 1 en la posición 1q31-32 y es altamente polimórfico. Un microsatélite y al menos siete polimorfismos en nucleótidos simples (SNP) han sido descritos en la posición, 1.2 Kb corriente arriba del gen, y un microsatélite adicional se ubica a 4kb corriente arriba. Hay evidencia que muestra que la capacidad de secretar IL-10 puede variar de acuerdo con el polimorfismo del locus de la IL-10 (127,128). Hulkkonen et al (128) observaron una discreta asociación entre un

SNP del gen de la IL-10 y SSp en caucásicos. El haplotipo IL-10 GCC (G en la posición -1082, C en la posición -819, y C en la posición -592) o el genotipo GCC/ATA fueron asociados con la enfermedad. De acuerdo a lo señalado anteriormente, es probable que esta diferencia en realidad no sea significativa dado que las múltiples comparaciones no fueron corregidas estadísticamente, y no se consideró un análisis de desequilibrio de ligamiento. García-Carrasco et al (129), observaron una asociación de estos SNP y manifestaciones clínicas de la enfermedad. Nuestro grupo (130), en población Colombiana con SS encontró que las concentraciones séricas de IL-10 e IFN-γ fueron mayores en los pacientes que en los controles ($p<0.01$); además, los niveles de IL-10 se correlacionaron con los títulos de FR tipo IgA, de anticuerpos anti-Ro y anti-La y con la severidad del infiltrado linfocítico ($p<0.04$).

Otros genes de citoquinas evaluados han sido el antagonista del receptor de la IL-1 (131), la IL-6 (132) y el TNF (133), entre otros. En la Tabla 8 están resumidas las principales asociaciones de diversos genes no-HLA y el SSp.

Tabla 8. Genes candidatos No-HLA en SSp.

Gen	Localización cromosómica
Lectinas de unión a la manosa	10q21.1
IL-10	1q36
Fas/FasL	10q23.31
TNF-α	6p21.3
IL-1RA	2q13
Glutatión S-Transferasa M1	1p13.3
Cadena V de las Igs	14p
BAK	6p21.3
TAP2	6p21.3
C4	6p21.3
Ro	11p

Tratamiento

En la actualidad el tratamiento del SS es básicamente sintomático. Se debe incluir un grupo interdisciplinario buscando lograr un manejo integral (134). En el caso de un SS secundario se debe tratar de forma oportuna la enfermedad de base, con manejo farmacológico y no farmacológico, según lo amerite.

Para el ojo seco se deben usar sustitutos lacrimales, cuántas veces sea necesario en el día, no menos de 4 veces, previniendo la ulceración corneal y conjuntivitis. Existe gran variedad de gotas disponibles, las cuales se diferencian principalmente en la viscosidad. Si los sustitutos no son lo suficientemente eficaces, el paciente puede beneficiarse de manejos diferentes, como la oclusión del conducto lacrimal, la ciclosporina A que puede ser utilizada tópicamente a nivel ocular, ya que ejerce su potente acción antiinflamatoria con poca absorción sistémica. También los andrógenos aplicados en la superficie ocular, pueden promover la secreción lagrimal y la función de las glándulas de Meibomio, mejorando la deficiencia acuosa y disminuyendo la mayor evaporación de la película lagrimal, presente en el ojo seco (135).

La pilocarpina oral (Salagen ® , tabletas de 5 mg), es útil para el manejo de los síntomas secos en pacientes con SS. Este fármaco es un agonista colinérgico inespecífico que estimula la contracción del músculo liso y de varias glándulas exocrinas, incluyendo salivares y lacrimales (136). Generalmente es bien tolerado, a pesar de efectos adversos leves, como aumento de la sudoración. Se administran 5 mg 4 veces al día con mejoría significativa de la sintomatología. La cevimelina (Evoxac ®), presenta gran afinidad por el receptor muscarínico M3, con un efecto más perdurable y menos efectos adversos que la pilocarpina. Está contraindicado en pacientes con asma no controlada. La dosis recomendada es de 30 mg (una cápsula) 3 veces al día (134).

El tratamiento de la xerostomía asociada al SS es difícil. Varias medidas deben ser tomadas en cuenta: 1. métodos que aumenten el flujo salivar y uso de sustitutos de saliva, 2. eliminación o reemplazo de factores y drogas que contribuyen a la disminución de las secreciones salivares (respiración oral, cigarrillo, drogas anticolinérgicas), 3. prevención y tratamiento de las caries dentales, y 4) diagnóstico y tratamiento de la candidiasis oral.

El tratamiento de la xerodermia incluye el uso tópico de cremas libres de alcohol y lociones humectantes. La sequedad vaginal debe tratarse con lubricantes estériles. Empíricamente, utilizamos dosis altas (1200 U/d) de vitamina E (α Tocoferol), dada sus propiedades antiastringente, antioxidante y analgésica (137). La xerotráquea puede mejorar con el manejo de la xerostomía y con el uso de mucolíticos (Bromhexina).

No hay un tratamiento efectivo para la parotidomegalia persistente. El dolor, fiebre o eritema, sugieren infección sobreagregada, cuyo tratamiento incluye amoxicilina 500 mg -ácido clavulánico125 mg. cada 8 horas por 7 días, calor local y antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La radiación local y las drogas citotóxicas no son efectivas y, por el contrario, son potencialmente peligrosas. Bajas dosis de esteroides han tenido resultados variables. Si la glándula permanece dolorosa o aumentada de volumen se debe descartar linfoma.

Compromiso no-exocrino

El manejo del compromiso articular en el SS incluye el uso de analgésicos y AINE. Los antimaláricos, por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias (138), son utilizados regularmente con excelente tolerancia a dosis no mayores de 6 mg/k/d de hidroxicloroquina o, de 4 mg/k/d de cloroquina. El uso de la hidroxicloroquina en el SS ha mostrado ser eficaz en el tratamiento del compromiso articular así como en la reducción de los niveles séricos de inmunoglobulinas (139). No obstante, los antimaláricos no han sido eficaces en el manejo de los síntomas secos.

Los corticoesteroides y drogas inmunosupresoras se utilizan sólo para tratar manifestaciones sistémicas seve-

ras incluyendo compromiso pulmonar, renal, vasculitis y miositis. No se recomiendan para el tratamiento de ojos secos y boca seca. Los pocos estudios reportados, recientemente revisados por Van der Reijden et al (140), muestran que no hay estudios con suficiente poder estadístico para hacer una recomendación válida.

Un estudio reciente en modelos murinos, mostró gran eficacia del anticuerpo monoclonal anti-CD4 utilizado localmente en los ojos, y más que la disminución del número de linfocitos T CD4+ se observó una disminución en la activación de estas células (141). La terapia con anti-TNF también está siendo utilizada en estos pacientes con resultados prometedores en los estudios adelantados (Tabla 9). También el uso de Rituximab -anticuerpo monoclonal anti-CD20-, se está utilizando en pacientes con SS con ésta y otras complicaciones (ver Capítulo 35). A la luz de la evidencia actual estas opciones terapéuticas estarían indicadas en casos de complicaciones refractarias al tratamiento actual y más estudios deben ser realizados para esclarecer el papel específico de estos medicamentos.

Comorbilidad

Al menos el 15% de los pacientes con SSp puede presentar una enfermedad asociada, entre las cuales la fibromialgia, la depresión, el hipotiroidismo no-autoinmune y la hipertensión arterial son las más frecuentes (139). El reconocimiento de estas enfermedades y su tratamiento es muy importante en el contexto de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por Colciencias, Bogotá, Colombia; Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología, Bogotá, Colombia; Fondecyt-Chile y Conicyt, Chile.

Tabla 9. Uso de terapia biológica en el Síndrome de Sjögren.

Agente Biológico	Dosis	No. pacientes tratados	Resultados	Ref.
Infliximab	3 mg/Kg IV	4 (SS con AR)		142
	3 mg/Kg IV (3 dosis totales)	16 (SS primario)	Mejoría rápida de parámetros clínicos y funcionales, sin efectos adversos mayores	143
	5 mg/Kg IV	1 (SS con neuropatía)		144
		10 (SS primario)	Mejoría sostenida en las manifestaciones locales y medición global de la enfermedad	145
		54 (SS primario)	Estudio doble ciego, randomizado que no mostró eficacia del infliximab en SS	146
		39 (SS primario)	Infliximab puede desencadenar la secreción de anticuerpos anti-DNAds, además aumenta los niveles de gammaglobulinas séricas.	147
Etanercept	25 mg SC 2 veces/semana por 12 semanas	15 (SS primario)	No disminución de síntomas y signos secos. Beneficio en subgrupo de pacientes con fatiga severa. No se obtuvo cambio en los resultados de la biopsia de glándula salivar menor.	148
Rituximab	375 mg/m^2/IV	1 (SS con linfoma)	Resolución del linfoma no-Hodgkin de la glándula parótida	149
		1 (SS con linfoma)	Mejoría de linfoma marginal	150
		6 (SS primario)	Mejoría en síntomas subjetivos (fatiga, síntomas secos y estado de salud), aumento en la función de las glándulas salivares.	151
		4 (SS con linfoma no-Hodgkin de células B agresivo)	Rituximab más terapia CHOP fue bien tolerado y efectivo. Signos y síntomas de la crioglobulinemia mixta concomitante mejoraron de forma significativa.	152
		1 (SS primario)	Mejoría en la parotidomegalia bilateral	EP

SS: Síndrome de Sjögren; AR: artritis reumatoide; EP: experiencia propia.

Referencias

1. Talal N. Sjogren's syndrome: historical overview and clinical spectrum of disease. Rheum Dis Clin NA 1992;18: 507-16
2. Goicovich E, Molina C, Pérez P, et al. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. Arthritis Rheum 2003; 48: 2573-84
3. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome: exocrine parenchyme destruction mechanisms. Arthritis Rheum 2000; 43: 2807-17
4. Strand V, Talal N. Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). Bull Rheum Dis 1980; 30: 1046-52
5. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. Clin Immunol Immunopathol 1994;72:162-5
6. Dafni UG, Tzioufas AG, Staikos P, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Prevalence of Sjögren´s syndrome in a closed rural community. Ann Rheum Dis 1997; 56: 521
7. Jacobsson LT, Axell TE, Hansen BU, et al. Dry eyes or mouth. An epidemiological study in Swedish adults with special reference to primary Sjogren´s syndrome. J Autoimmun 1989; 2: 521
8. Soto-Rojas AE, Villa AR, Sifuentes-Osornio J, Alarcon-Segovia D, Kraus A. Oral manifestations in patients with Sjögren's syndrome. J Rheumatol 1998;25:906-10.
9. Oxholm P, Asmussen K, Axell T, et al. Sjögren's syndrome: terminology. Clin Exp Rheumatol 1995; 13: 693-6
10. Pavlidis NA, Drosos AA, Papadimitriou C, Talal N, Moutsopoulos HM. Lymphoma in Sjogren's syndrome. Med Pediatr Oncol 1992; 20: 279-83
11. Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2002; 46: 741-7
12. Anaya JM, Ogawa N, Talal N. Sjögren's Syndrome in Childhood. J Rheumatol 1995; 22: 1152-8
13. Anaya JM, Liu GT, D'Souza E, Ogawa N, Luan X, Talal N. Primary Sjögren's syndrome in men. Ann Rheum Dis 1995; 54: 748-51
14. Cervera R, Font J, Ramos-Casals M, et al. Primary Sjögren's syndrome in men: clinical and immunological characteristics. Lupus 2000; 9: 61-4
15. Anaya JM, Talal. Sjögren's syndrome and connective tissue diseases associated with other immunologic disorders. En: Koopman W (ed). Arthritis and Allied Conditions, 13th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997: 1561-80
16. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Clasification criteria for Sjögren's syndrome. A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis 2002; 61: 554-8
17. Ramos M, Cervera R, Garcia-Carrasco M, et al. Síndrome de Sjögren primario: características clínicas e inmunológicas en una serie de 80 pacientes. Med Clin (Barcelona) 1997; 108: 652-7
18. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD. Síndrome de Sjögren primario. Manifestaciones clínicas e inmunogenéticas. Acta Med Colomb 1999; 24: 127-36
19. Skopouli FN, Dafni U, Ioannidis JP, Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primaru Sjögren's syndrome. Semin Arthritis Rheum 2000; 29: 296-304
20. Yamamoto K. Pathogenesis of Sjogren syndrome. Autoimmun Rev 2003;2: 13-18
21. James JA, Harley JB, Scofield RH. Role of viruses in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol 2001; 13: 370-6
22. Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos H. Evidence for Coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2004; 50: 2897-2902.
23. Cauli A, Yanni G, Pitzalis C, Challacombe S, Panayi GS. Cytokine and adhesion molecule expression in the minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and chronic sialoadenitis. Ann Rheu Dis 1999; 54: 209-15
24. Tapinos NI, Polihronis M, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome. Autoimmune epithelitis. Adv Exp Med Biol 1999;455: 127-134
25. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. J Rheumatol 1991; 18: 210-14
26. Kaschner S, Hansen A, Jacobi A, et al. Immunoglobulin Vlambda light chain gene usage in patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001; 44: 2620-32
27. Bohnhorst J, Bjorgan MB, Thoen JE, Jonsson R, Natvig JB, Thompson KM. Abnormal B cell differentiation in primary Sjogren syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with serum IgG concentration. Clin Immunol 2002; 103: 79-88
28. Pavlidis NA, Drosos AA, Papadimitriou C, Talal N, Moutsopoulos HM. Lymphoma in Sjogren's syndrome. Med Pediatr Oncol 1992; 20: 279-83
29. Ioannidis JP, Vassiliou VA, Moutsopoulos HM. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2002; 46: 741-47
30. Dong HY, Shahsafaei A, Dorfman DM. CD148 and CD27 are expressed in B cell lymphomas derived from both memory and naive B cells. Leuk lymphoma 2002; 43: 1855-8
31. Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. Science 1997; 276: 604-7
32. Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjogren's syndrome. Clin Exp Immunol 1996; 104: 454-9
33. Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R, Borda E. Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjogren's syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: 151-6
34. Borda E, Camusso JJ, Perez Leiros C, et al. Circulating antibodies against neonatal cardiac muscarinic acetylcholine receptor in patients with Sjogren's syndrome. Mol Cell Biochem 1996; 163-164: 335-41.
35. Henriksson G, Manthorpe R, Bredberg A. Antibodies to CD4 in primary Sjogren's syndrome. Rheumatology 2000; 39: 142-7
36. Chan EKL, Andrade LEC. Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. Rheum Dis Clin NA 1992; 18: 551-70
37. Troster H, Metzger TE, Semsei I, et al. One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjogrens' syndrome. J Exp Med 1994; 180: 2059-67
38. Humphreys-Beher MG, Brayer J, Yamachika S, Peck AB, Jonsson R. An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. Scand J Immunol 1999; 49: 7-10
39. Robinson CP, Brayer J, Yamachika S, et al. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igmu null mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjogren's syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7538-43
40. Bacman S, Sterin-Borda L, Cmusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 1996; 104: 454-9
41. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. J Immunol 1994; 152: 5532-9
42. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol 2002; 128: 562-8
43. Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. Br J Rheumatol 1995; 34: 326-33
44. D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, et al. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. Nat Immunol 2000; 1: 387-91
45. Saito I, Haruta K, Shimuta M, et al. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. J Immunol 1999; 162: 2488-94
46. Balasa B, La Cava A, Van Gunst K, et al. A mechanism for IL-10-mediated diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse: ICAM-1 deficiency blocks accelerated diabetes. J Immunol 2000; 165: 7330-7
47. Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. J Exp Med 1993; 177: 295-304
48. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. J Clin Invest 2002; 109: 59-68
49. Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2003; 62: 168-71
50. Hansen A, Lipsky P, Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren's syndrome: many questions, fewer answers. Curr Opin Rheumatol 2003; 15: 563-70
51. Saito I, Terauchi K, Shimuta M, et al. Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjogren's síndrome. J Clin Lab Anal 1993; 7: 180-7

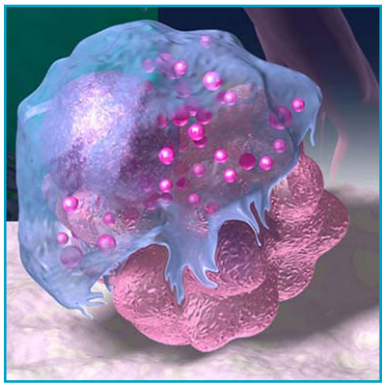
52. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456-62
53. Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. J Immunol 1996; 156: 153-9
54. Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, et al. Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjogren syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5767-71
55. Kong L, Robinson CP, Peck AB, et al. Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. Clin Exp Rheumatol 1998; 16: 675-81
56. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 1997; 40:87-97
57. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 1666-73
58. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. Mutat Res 2001; 488: 211-31
59. Bolstad AI, Wargelius A, Nakken B, Haga HJ, Jonsson R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2000; 27: 2397-2405
60. Kong L, Ogawa N, McGuff HS, et al. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction. Clin Immunol Immunopathol 1998; 88: 133-41
61. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, et al. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. J Biol Chem 1997; 272: 16351-7
62. Pammer J, Weninger W, Ban J, Wojta J, Tschachler E. The cell death regulatory protein bak is expressed in endothelial cells in inflamed tissues and is induced by IFN-gamma in vitro. Biochem Biophys Commun 1999; 264: 139-43
63. Nakamura H, Kawakami A, Tominaga M, et al. Expression of CD40/CD40 ligand and Bcl-2 family proteins in labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. Lab Invest 1999; 79: 261-9
64. Nakamura H, Kawakami A, Yamasaki S, Kawabe Y, Nakamura T, Eguchi K. Expression of mitogen activated protein kinases in labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis 1999; 58: 382-5
65. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem 1999; 274: 22532-8
66. Masago R, Aiba-Masago S, Talal N, et al. Elevated proapoptotic Bax and caspase 3 activation in the NOD.scid model of Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2001; 44: 693-702
67. Polihronis M, Tapinos NI, Theocharis SE, Economou A, Kittas C, Moutsopoulos HM. Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS). Clin Exp Immunol 1998; 114: 485-90
68. Molina C, Alliende C, Aguilera S, et al. Basal lamina disorganization of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: association to mononuclear cell infiltration. Ann Rheum Dis 2005 (en prensa)
69. Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, et al. Preferential localization of CD8+ alpha E beta 7+ T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. J Immunol 1999; 163: 2226-35
70. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13: 350-65
71. Gonzalez MJ, Molina C, Alliende C, Pérez P, Goicovich E. Matriz Extracelular de glándulas salivales en el Síndrome de Sjögren. En: "Síndrome de Sjögren". JM Anaya, M Ramos, M. García (Editores). Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia 1ª Ed. capitulo 12, 2001: 113-30
72. Pérez P, Aguilera S, Julio M, et al. Imbalance in mRNA and protein ratios of MMP-3/Timp-1 and MMP-9/Timp-1 correlates with labial salivary gland damage in patients with Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2004; 63: 348
73. Kwon YJ. Remodelación de láminas basales de acinos y ductos de glándulas labiales de pacientes con síndrome de Sjögren. Tesis para optar al título profesional de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile; 2004
74. Ou D, Mitchell LA, Tingle AJ. A new categorization of HLA DR alleles on a functional basis. Hum Immunol 1998; 59: 665-76
75. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. Cell 1994; 78: 931-6
76. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression Trends Cell Biol 2001; 11: 66-75
77. Anaya JM, Jimenez F, Restrepo S, et al. Oxido nítrico en el síndrome de Sjögren. Posible participación en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria. Acta Med Colomb 1999; 24: 84-90
78. De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, et al. Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 5480-5
79. Xu W, Liu L, Smith GC, Charles G. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti tumor agents. Nat Cell Biol 2000; 2: 339-45
80. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, et al. Fas-induced caspase denitrosylation. Science 1999; 284: 651-4
81. Goicovich E, Molina C, Pérez P, et al. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. Arthritis Rheum 2003; 48: 2573-84
82. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome: exocrine parenchyme destruction mechanisms. Arthritis Rheum 2000; 43: 2807-17
83. Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. J Cell Biol 1995; 129: 867-79
84. Alliende C, Ledesma AL, Molina C, Aguilera S, González MJ. Cell proliferation in salivary glands from syndrome de Sjögren patients. XVI Annual Meeting of International Association for Dental Research. Chile; 2003
85. González MJ, López-Solis RO, Brañes MC, Alliende C. Plasma membrane desialylation and DNA synthesis are induced via adrenergic receptors of B1-subtype in mouse parotid glands. Biochim Biophys Acta 1994; 1222: 208-14
86. Andoh Y, Shimura S, Sawai T, Sasaki H, Takishima T, Shirato K. Morphometric analysis of airways in Sjogren's syndrome. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 1358-62
87. Leroy JP, Pennec YL, Soulier C, Berthelot JM, Letoux G, Youinou P. Follow up study labial salivary gland lesions in primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 1992; 51: 777-80
88. Fox ES, Brower JS, Bellezzo JM, Leingang KA. N-acetylcysteine and alpha-tocopherol reverse the inflammatory response in activated rat Kupffer cells. J Immunol 1997; 158: 5418-23
89. Soliven B, Szuchet S. Signal transduction pathways in oligodendrocytes: role of tumor necrosis factor-alpha. Int J Dev Neurosci 1995; 13: 351-67
90. Molina C, Pérez P, Kwon Y, et al. Quality and quantity of mucins from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome correlated to acini basal lamina disorganization. Ann Rheum Dis 2003; 62: 126
91. Brito M, Alliende C, KwonYJ, et al. MUC5B and MUC7 expression in acini from salivary gland with exocrinopathies. XVIII Congreso Anual Sociedad de Biología Celular de Chile; 2004, Libro resumen, pág. 29
92. Raina S, Preston G M, Guggino WB, Agre P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. J Biol Chem 1995; 270: 1908-12
93. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. J Biol Chem 1999; 274: 20071-4
94. Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients. Lab Invest 2001; 81: 143-8
95. Tanriverdi F, Silveira LFG, MacColl GS, Bouloux PMG. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. J Endocrin 2003; 176: 293-304
96. Lockshin M. Sex ratio and rheumatic disease. Autoimmun Rev 2002; 1: 162-7
97. Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, et al. Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome. Ann N Y Acad Sci 1999; 876: 312-24
98. Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE, et al. Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. Ann N Y Acad Sci 2002; 966: 211-22
99. van Seunningen I, Pigny P, Perrais M, Porchet N, Aubert JP. Transcriptional regulation of 11P15 mucin genes towards new biological tools in human therapy in inflammatory diseases and cancer. Frontier Bioscience 2001, 6: 1216-34
100. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerolonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nat Gen 1998; 19: 56-9
101. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. Science 1999; 285: 2122-5
102. Balomenos D, Martin-Caballero J, Garcia MI, et al. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex- linked lupus development. Nat Med 2000; 6: 171-6
103. Walport MJ. Lupus, DNase and defective disposal of cellular debris. Nat Genet 2000; 25: 135-6

104. Inoue H, Tsubota K, Ono M, et al. Possible involvement of EBV-mediated a-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjögren's syndrome. J Immunol 2001; 166: 5801-9
105. Revielle JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB, Arnett FC. Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. Ann Intern Med 1984; 101: 748-56
106. Lichtenfeld JL, Kirschner RH, Wiernik PH. Familial Sjögren's syndrome with associated primary salivary gland lymphoma. Am J Med 1976; 60: 286-92
107. Becker K. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. Med Hypotheses 2004; 62: 309-17
108. Vitali C, Tavoni A, Rizzo G, et al. HLA antigens in Italian patients with primary Sjögren´s syndrome. Ann Rheum Dis 1986; 45: 412-6.
109. Fei HM, Kang H, Scharf S, Erlich H, Peebles C, Fox R. Specific HLA-DQA and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to Sjögren's syndrome and autoantibody production. J Clin Lab Anal 1991; 5: 382-91
110. Morling N, Andersen V, Fugger L, et al. Immunogenetics of rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome: DNA polymorphism of HLA class II genes. Dis Markers 1991; 9: 289-96.
111. Roitberg-Tambur A, Brautbar C, Markitziu A, Ben-Chetrit E, Rubinow A, Friedmann A. Immunogenetics of HLA class II genes in primary Sjögren's syndrome in Israeli Jewish patients. Isr J Med Sci 1990; 26: 677-81
112. Kang HI, Fei HM, Saito I, et al. Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol 1993; 150: 3615-23
113. Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Safirman C, et al. Molecular analysis of HLA class II genes in primary Sjögren's syndrome. A study of Israeli Jewish and Greek non-Jewish patients. Hum Immunol 1993; 36: 235-42
114. Guggenbuhl P, Jean S, Jego P, et al. Primary Sjögren's syndrome: role of the HLA-DRB1*0301-*1501 heterozygotes. J Rheumatol 1998; 25: 900-5
115. Fox RI, Bumol T, Fantozzi R, Bone R, Schreiber R. Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1986; 29: 1105-11
116. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with and influenza virus peptide. Nature 1994; 368: 215-21
117. Ou D, Mitchell LA, Tingle AJ. HLA-DR restrictive supertypes dominate promiscuous T cell recognition: association of multiple HLA-DR molecules with susceptibility to autoimmune diseases. J Rheumatol 1997; 24: 253-61
118. Price P, Witt C, Allcock R, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. Immunol Rev 1999; 167: 257-74
119. Garcia Portales R, Belmonte Lope MA, Camps Garcia MT, et al. Inmunogenética del síndrome de Sjögren en el sur de España. An Med Intern (Madrid) 1994; 11: 56-61
120. http://www.anthonynolan.com/HIG/data.htlm
121. Momburg F, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Tap peptide transporters and antigen presentation. En: Urban, RG and Chicz RM (Eds), MHC Molecules: Expression, Assembly and Function. New York, NY, Chapman and Hall, 1996: 36-63
122. Collin P, Polvi A, Korpela M, Partanen J, Mäki M. Distinct immunologic features of Finnish Sjögren's syndrome patients with HLA alleles DRB1*0301, DQA1*0501, and DQB1*0201. Alterations in circulating T cell receptor gamma/delta subsets. Arthritis Rheum 1996; 39: 1733-9
123. Bolstad AI, Wassmuth R, Haga HJ, Jonsson R. HLA markers and clinical characteristics in Caucasians with primary Sjögren's syndrome. J Rheumatol 2001; 28: 1554-62
124. Gershwin ME, Terasaki PI, Graw R, Chused TM. Increased frequency of HLA-A8 in Sjögren's syndrome. Tissue Antigens 1975; 6: 342-6
125. Ivanyi D, Drizhal I, Erbenova E, et al. HL-A in Sjogren syndrome. Tissue Antigens 1976; 7: 45-51
126. Loiseau P, Lepage V, Djelal F, et al. HLA class I and class II are both associated with the genetic predisposition to primary Sjögren syndrome. Hum Immunol 2001; 62: 725-31
127. Eskdale J, Gallagher G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. Immunogenetics 1995; 42: 444-45
128. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Lahdenpohja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2001; 44: 176-9
129. García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Aldea AL, et al. Polymorphism of the interleukin 10 promoter in patients with primary Sjögren's syndrome (resumen). Arthritis Rheum 2000; 43: S174
130. Anaya JM, Correa PA, Herrera M, Eskdale J, Gallagher G. Interleukin-10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjögren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism. J Rheumatol 2002; 29: 1874-6
131. Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuisson E, Sauvezie B. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol 1998; 87: 309-13
132. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. Rheumatology 2001; 40: 656-61
133. Guggenbuhl P, Veillard E, Quelvenec E, et al. Analysis of TNF alpha microsatellites in 35 patients with primary Sjogren's syndrome. Joint Bone Spine 2000; 67: 290-5
134. Anaya JM, Talal N. Sjögren's syndrome comes of age. Semin Arthritis Rheum 1999; 28: 353-8
135. Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, et al. Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome. Ann NY Acad Sci 1999; 876: 312-24
136. Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren's Syndrome. Arch Intern Med 1999; 159: 174-81
137. Edmonds SE, Winyard PG, Guo R, et al. Putative analgesic activity ofrepeated doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid artritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial. Ann Rheum Dis 1997; 56: 649-55
138. Anaya JM, Mantilla RD. Manejo Integral. En: "Síndrome de Sjögren". JM Anaya, M Ramos, M. García (Editores). Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia, 2001
139. Vitali C, Tavoni A, Neri R, Castrogiovanni P, Pasero G, Bombardieri S. Fibromyalgia features in patients with primary Sjögren's syndrome. Scand J Rheumatol 1989; 18: 21-27
140. van der Reijden WA, Vissink A, Veerman EC, Amerongen AV. Treatment of oral dryness related complaints (xerostomía) in Sjögren's síndrome. Ann Rheum Dis 1999; 58: 465-73
141. Hayashi Y, Ishimaru N, Arakaki R, et al. Effective treatment of a mouse model of Sjögren's syndrome with eyedrop administration of anti-CD4 monoclonal antibody. Arthritis Rheum 2004; 50: 2903-10
142. Martin Martin LS, Migliore A, Todino V, Pagano A, Chianelli M. Infliximab therapy in patients with secondary Sjogren's syndrome: functional evaluation. Clin Exp Rheumatol 2003;21:412
143. Steinfeld SD, Demols P, Salmon I, Kiss R, Appelboom T. Infliximab in patients with primary Sjogren's syndrome: a pilot study. Arthritis Rheum 2001;44:2371-5
144. Caroyer JM, Manto MU, Steinfeld SD. Severe sensory neuronopathy responsive to infliximab in primary Sjogren's syndrome. Neurology. 2002; 59: 1113-4
145. Steinfeld SD, Demols P, Appelboom T. Infliximab in primary Sjogren's syndrome: One-year followup. Arthritis Rheum. 2002; 46: 3301-3
146. Mariette X, Ravaud P, Steinfeld S, et al. Inefficacy of infliximab in primary Sjogren's syndrome: results of the randomized, controlled Trial of Remicade in Primary Sjogren's Syndrome (TRIPSS). Arthritis Rheum 2004; 50: 1270-6
147. Goetz J, Sordet C, Gottenberg J, et al. Evolution of autoantibodies and of serum levels of immunoglobulins in patients treated with Infliximab for primary Sjögren's syndrome: results of the controlled Trial TRIPSS (Trial of Remicade in Primary Sjögren's Syndrome) (resumen). Arthritis Rheum 2004; 50(Suppl): S575
148. Zandbelt MM, de Wilde P, van Damme P, Hoyng CB, van de Putte L, van den Hoogen F. Etanercept in the treatment of patients with primary Sjogren's syndrome: a pilot study. J Rheumatol. 2004; 31: 96-101
149. Shih WJ, Ghesani N, Hongming Z, Alavi A, Schusper S, Mozley D. F-18 FDG positron emission tomography demonstrates resolution of non-Hodgkin's lymphoma of the parotid gland in a patient with Sjogren's syndrome: before and after anti-CD20 antibody rituximab Sjogren's syndrome following therapy with rituximab for marginal zone lymphoma. Arthritis Rheum 2003; 49: 394-8
150. Somer BG, Tsai DE, Downs L, Weinstein B, Schuster SJ. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Improvement in Sjogren's syndrome following therapy with rituximab for marginal zone lymphoma. Arthritis Rheum. 2003; 49: 394-8
151. Pijpe J, Bootsma H, Van Imhoff G, et al. Rituximab (anti-CD20) for the treatment of primary Sjögren's syndrome (resumen). Arthritis Rheum 2004; 50(Suppl.): S575
152. Voulgarelis M, Giannouli S, Anagnostou D, Tzioufas AG. Rituximab plus CHOP for the treatment of Sjögren's syndrome-associated B-cell aggressive non-Hodgkin's lymphomas (resumen). Arthritis Rheum 2004; 50(Suppl.): S575

25

DIABETES MELLITUS AUTOINMUNE (TIPO 1A)

Gabriel Jaime Tobón
Álvaro Arango
Juan-Manuel Anaya



La diabetes mellitus tipo 1A es una enfermedad causada por la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas productoras de insulina. Estudios en animales indican que esta destrucción es el resultado de una respuesta inmune mediada por células T. Al menos 20 genes diferentes han sido ligados con la patología, de los cuáles los más importantes son los genes del HLA. Los estudios inmunológicos han identificado tres autoantígenos mayores: GAD 65, IA-2 e insulina. Los autoanticuerpos dirigidos contra estos antígenos aparecen años antes del desarrollo de los síntomas clínicos y por lo tanto se han convertido en marcadores de predicción de la patología en personas con alto riesgo (ejemplo, familiares de pacientes con diabetes tipo 1). Los síntomas de la patología se derivan de una ausencia casi completa de insulina. No se disponen aún medidas preventivas para evitar el desarrollo de la enfermedad en personas susceptibles, ni terapias inmunosupresores eficaces. Debido a esto el manejo se basa en la terapia con suplencia de insulina. Avances recientes en este último aspecto se han realizado recientemente lo que ha llevado a un mejor control metabólico, esencial para la prevención de complicaciones crónicas.

Contenido

Epidemiología
Aspectos genéticos
Aspectos ambientales
Aspectos inmunológicos
Patogénesis
Presentación clínica
Laboratorio
Predicción
Prevención y nuevas terapias
Tratamiento

Introducción

La diabetes mellitus autoinmune -o diabetes mellitus tipo 1A- (DMT1A) es una enfermedad autoinmune órgano-específica, que afecta las células beta del páncreas productoras de insulina, llevado, luego de un proceso inflamatorio, a una deficiencia crónica de insulina en individuos genéticamente susceptibles (1). La manifestación clínica (hiperglicemia) representa el estadio final de la insulitis (proceso inflamatorio en los islotes pancreáticos). En el momento del diagnóstico sólo entre el 10 al 20% de las células beta productoras de insulina continúan funcionando (2). Hasta la fecha no existen medidas preventivas o terapias inmunosupresoras que puedan evitar el daño y las manifestaciones de la enfermedad. Sin embargo, el conocimiento cada vez mayor de la fisiopatología e inmunogenética de esta enfermedad ha tenido importantes repercusiones terapéuticas hacia medidas encaminadas a su prevención.

En 1997, el Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes, recomendó dividir la DMT1 en diabetes tipo 1A (mediada inmunológicamente) y tipo 1B (otras formas de diabetes con severa deficiencia de insulina, pero sin demostración de autoinmunidad, o idiopáticas) (1) (Tabla 1). El mejor método diagnóstico de DMT1A es la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en los islotes pancreáticos, detectados por medio de métodos altamente específicos (3). Sin embargo, con las herramientas actuales para la detección de estos autoanticuerpos, un subgrupo de niños (< 10%) con DMT1 son negativos para dichos anticuerpos (4-6). Algunos de estos pacientes, aunque no se evidencie autoinmunidad, han presentado a medida que progresa la enfermedad, una disminución en los títulos desde el periodo prediabético hasta la fase clínica, lo cual explicaría porque este porcentaje de pacientes en el momento de la manifestación clínica no tienen autoanticuerpos positivos (6). En la Tabla 2 se presentan los principales parámetros para el diagnóstico diferencial de la diabetes mellitus.

La DMT1A, a pesar de ser una enfermedad autoinmune, posee características que la diferencian de otras enfermedades autoinmunes. Es una patología que se presenta en una relación uno a uno (género masculino: género femenino), diferente a otras enfermedades autoinmunes descritas ampliamente en esta misma obra, como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, las cuales se presentan de forma principal en el género femenino.

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

I.	Diabetes mellitus tipo 1 (destrucción de las células beta del páncreas, usualmente acompañado de deficiencia absoluta de insulina). A. Mediada inmunológicamente B. Idiopática
II.	Diabetes mellitus tipo 2 (puede variar desde resistencia a la insulina predominantemente con deficiencia relativa de insulina, hasta un defecto predominante en la secreción de insulina, sumado a resistencia periférica a esta).
III.	Tipos específicos de diabetes Entre ellos trastornos genéticos en la función de la célula beta del páncreas (ej. MODY), enfermedades del páncreas exocrino (ej. pancreatitis, hemocromatosis), inducidas por fármacos o tóxicos (ej. pentamidina, glucocorticoides, Vacor), infecciones, endocrinopatías (acromegalia, síndrome de Cushing).
IV.	Diabetes mellitus gestacional.

MODY: en ingles, Maturity onset of diabetes of the young (diabetes juvenil de comienzo en el adulto).
Tomado de Referencia 1.

Epidemiología

La incidencia de la DMT1A está aumentando en todo el mundo, al tiempo que se presenta a una edad más temprana (7). La enfermedad ha sido considerada siempre como una enfermedad de la infancia, pero estudios epidemiológicos recientes han sugerido que la incidencia es comparable en población adulta (8). Existe una enorme diferencia en la incidencia de la enfermedad de acuerdo a la población estudiada. Un niño en Finlandia tiene 40 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que un niño en Japón y 100 veces más que un niño en Zunyi (China). (7). La incidencia de la enfermedad se ha calculado en

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de la diabetes mellitus tipo 1A.

Clasificación	Autoanticuerpos	Genética	Observaciones
Diabetes mellitus tipo 1A	Positivos en más del 90% de los pacientes*	Susceptibilidad genética por alelos del HLA-II: 30-50% de los pacientes son DR3 y DR4; 90% DR3 ó DR4	Alta prevalencia en Finlandia y Sardinia.
Diabetes mellitus tipo 1B#	Negativos	Desconocida	Rara en pacientes caucásicos.
Diabetes mellitus tipo 2	Negativos	Desconocida	Si hay presencia de autoanticuerpos es probablemente diagnóstico de LADA.
Otras formas de diabetes	Negativos	MODY	

LADA: Latent autoimmune diabetes adult (diabetes autoinmune latente del adulto).
MODY: Maturity onset of diabetes of the young (diabetes juvenil de comienzo en el adulto).
* Hay que mencionar que pueden existir otros marcadores de autoinmunidad, como autoanticuerpos dirigidos contra componentes de los islotes, pero no determinados de forma rutinaria en el laboratorio, o la presencia de otros autoanticuerpos que indiquen un fenómeno autoinmune de base.
\# Diabetes tipo 1 idiopática.
Adaptado de Referencia 69.

0.1/100.000 habitantes por año en países como China y Venezuela, hasta 36.8/100.000 por año en Sardinia y 36.5/100.000 en Filandia (9). Estas cifras representan una variación mayor de 350 veces en la incidencia entre 100 poblaciones diferentes en el mundo (9). El estudio EURODIAB, que involucró registros en 44 países de Europa, mostró un incremento anual en la incidencia entre el 3 y 4% (10). El mayor incremento se observa en niños entre 0 y 4 años. La enfermedad se diagnostica más en meses de invierno en los países con alta incidencia, sugiriendo un componente ambiental, al menos como disparador de la patología (9).

La DMT1A está asociada con la presencia de otras enfermedades autoinmunes, principalmente enfermedad tiroidea autoinmune y enfermedad celiaca (11). El Registro Belga de Diabetes mostró una prevalencia de anticuerpos antitiroideos en el 22% de los pacientes con DMT1A. Aproximadamente 1 de 10 pacientes expresan anticuerpos IgA contra la transglutaminasa y más de la mitad de estos pacientes tienen enfermedad celiaca demostrada en biopsia intestinal. Al menos 1 de cada 50 pacientes con DMT1A poseen anticuerpos contra la 21-hidroxilasa, y aproximadamente el 25% de estos pacientes progresan a la presentación clínica de enfermedad de Addison (Tabla 3). De otra parte, existe una agregación familiar de enfermedades autoinmunes en familias donde existe un miembro afectado de DMT1A (Tabla 4).

Aspectos genéticos

Diversos alelos o variantes genéticas pueden estar asociadas con la enfermedad, tanto como factor de riesgo como factor protector. La concordancia de la patología es aproximadamente del 50% en gemelos monocigóticos y el riesgo de padecer la enfermedad un familiar de primer grado es cerca del 6% (12). Comparando esta última incidencia, con la presentación de la enfermedad en la población (0.4%), el riesgo está incrementado en 15 veces en un hermano de un paciente con DMT1A (Tabla 5). Aunque el riesgo de presentar la patología es mucho mayor en los familiares de los pacientes con DMT1A, es importante resaltar que la mayoría (más del 85%) de los individuos quienes desarrollan la patología no tienen un familiar de primer grado con la enfermedad. Esta alta frecuencia de casos esporádicos, resulta principalmente porque casi el 40% de los individuos en la población general son portadores de alelos de alto riesgo del HLA para la patología.

Existen diferentes genes de susceptibilidad para el desarrollo de la patología, determinados tanto por estudios de asociación, como por estudios de ligamiento. De esta forma, al menos 18 loci han sido caracterizados y denomi-

Tabla 3. Enfermedades autoinmunes presentes en pacientes con diabetes mellitus tipo 1A.

Enfermedad	Prevalencia de autoanticuerpos	Prevalencia de la patología (%)
Tiroiditis o enfermedad de Graves	25 % (antiperoxidasa o anti- tiroglobulina)	4
Enfermedad celiaca	12 % (transglutaminasa) (70)	6
Enfermedad de Addison	1.5% (21-hidroxilasa) (71)	0.5
Anemia Perniciosa	21 % (célula parietal) (72)	2.6

La prevalencia de los anticuerpos se determina en individuos con diabetes mellitus tipo 1A posean o no síntomas o signos de la patología. Para determinar la prevalencia de la patología se basa en hallazgos clínicos, tanto signos como síntomas y exámenes paraclínicos que lo comprueben (por ejemplo en tiroiditis niveles de TSH alterados y biopsia positiva en enfermedad celiaca).
Adaptado de referencia 69.

Tabla 4. Agregación familiar de otras enfermedades autoinmunes en familiares de primer grado de pacientes con diabetes mellitus tipo 1A.

Enfermedad autoinmune	Número de enfermedades autoinmunes en FPG de los pacientes			Número de enfermedades autoinmunes en FPG de los controles		
	Todos	F	M	Todos	F	M
Anemia megaloblástica	1	1	0	0	0	0
Lupus eritematoso sistémico	1	0	1	0	0	0
Vitiligo	1	0	1	3	0	3
Diabetes mellitus autoinmune	8	7	1	0*	0	0
Hipotiroidismo autoinmune	15	7	8	6†	4	2
Número de enfermedades autoinmunes en FPG	26/312‡ 8.3%	15/312 4.8%	11/312 3.5%	9/362§ 2.4%	4/362¥ 1.1%	5/362 1.3%

Estos resultados son derivados de un estudio realizado por nuestro grupo en el cuál se evaluaron 98 casos y 113 controles.
FPG: familiares de primer grado; F: femenino; M: masculino; OR: razón de disparidad; CI: intervalo de confianza.

* Comparando la frecuencia de DMT1A en FPG de los casos y los controles se obtuvo diferencia significativa. OR: 20.24, 95%CI = 1.16-352.3, p = 0.002.

† Comparando la frecuencia de hipotiroidismo autoinmune en FPG en casos y controles. OR: 3, 95% CI = 1.15-7.82, p = 0.02.

‡ Se observaron 26 enfermedades autoinmunes en 25 FPG. Hubo un FPG que tuvo dos enfermedades autoinmunes. Ningún FPG entre los controles sufrió de más de una enfermedad autoinmune.

§ Comparando la frecuencia de enfermedades autoinmunes en FPG de los casos y los controles. OR: 3.56, 95%CI = 1.64-7.32, p = 0.0008.

¥ Comparando la frecuencia de enfermedades autoinmunes en FPG mujeres en casos y controles. OR: 4.63, 95% CI = 1.52-14.1, p = 0.0041.

Tabla 5. Riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 1A.

Persona afectada con diabetes	% de Diabetes Mellitus en la infancia (incidencia/año)	Anticuerpos antiislotes	Comentarios
Población general en Estados Unidos	0.3% (15–25/100,000)	3% único anticuerpo 0.3% multiples anticuerpos	Incidencia en Japón 1/100,000 La incidencia se está incrementando en Estados Unidos y muchos países de Europa
Hijos	1%	4.1%	
Hermano	3.2%, 6% durante toda la vida	7.4%	
Gemelo dicigótico	6%	10%	
Madre	2%	5%	Riesgo más bajo que hijos de padres con diabetes mellitus
Padre	4.6%	6.5%	
Padre y madre	10% NC	NC	
Gemelo monocigótico	50% La incidencia varía de acuerdo con la edad del caso índice	50%	En Japón el riesgo es del 40%

NC: Datos no confirmados o completamente conocidos.
Adaptado de referencia 69.

nados como IDDM (Tabla 6). El mayor determinante genético para la patología se encuentra en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto del cromosoma 6 (sitio llamado IDDM1). Más del 90% de las personas que desarrollan DMT1A son portadores ya sea del marcador DR3 ó DR4 ó ambos, comparado con sólo el 40% de los controles normales que poseen estos marcadores del HLA (13).

La heterocigocidad DR3-DR4 es mayor en niños que desarrollan la enfermedad antes de los 5 años de edad (50%), y menor en adultos quienes desarrollan la enfermedad (20-30%), comparado con la presentación en el 2.4% de una población en los Estados Unidos. En la Tabla 7 se presentan los haplotipos del HLA clase II, DR y DQ, asociados tanto con la enfermedad como con protección de ésta. Una correlación significativa asociada con la susceptibilidad o resistencia para la enfermedad se encontró en el aminoácido 57 de la cadena DQβ del HLA. Si un residuo de ácido aspártico ocupa la posición 57 en ambos alelos de la

Tabla 6. Loci candidatos de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes autoinmune.

Locus	Localización	Marcadores o genes
IDDM1	6p21.3	HLA-DRB1, DQB1,DQA1
IDDM2	11p15	INS VNTR
IDDM3	15q26	D15S107
IDDM4	11q13	FGF3, D11S1337
IDDM5	6q25	ESR
IDDM6	18q21	JK, D18S487
IDDM7	2q31	HOXD8, D2S152
IDDM8	6q27	D6S264, D6S446
IDDM9	3q21-q25	D3S1576
IDDM10	10p11-q11	D10S193
IDDM11	14q24.3-q31	D14S67
IDDM12	2q33	CTLA-4
IDDM13	2q35	D2S164
IDDM14	-	-
IDDM15	6q21	D6S283
IDDM16	14q32.3	D14S542, IGH
IDDM17	10q25	D10S554
IDDM18	5q33-q34	IL12B
No nombrado	1q42	D1S1617
No nombrado	16q22-q24	D16S3098
No nombrado	19p13	D19S247
No nombrado	19q13	D19S225
No nombrado	Xp13-p11	DXS1068
No nombrado	7p13	GCK
No nombrado	12q14-q15	IFNG

Tabla 7. Riesgo de diabetes de diferentes haplotipos del HLA DR y DQ.

	DRB1	DQA1	DQB1
Alto riesgo			
	0401 ó 0403, ó 0405	0301	0302 (DQ8)
	0301	0501	0201 (DQ2)
Riesgo moderado			
	0801	0401	0402
	0404	0301	0302
	0101	0101	0501
	0901	0301	0303
Protección moderada			
	0403	0301	0302
	0701	0201	0201
	1101	0501	0301
Protección fuerte			
	1501	0102	0602 (DQ6)
	1401	0101	0503
	0701	0201	0303

Adaptado de referencia 69

cadena, existe poca probabilidad que ocurra la diabetes. En cambio su ausencia es un importante marcador de susceptibilidad. El riesgo relativo para DMT1A en individuos quienes ambos alelos no son ácido aspártico es de 107. Más recientemente se ha demostrado que la presencia del aminoácido arginina en la posición 52 de la cadena DQα confiere un riesgo incrementado de la patología. Este riesgo es aditivo con el incremento en el riesgo conferido por la ausencia del ácido aspártico en la posición 57 de la cadena DQβ. Se cree que la ausencia de este último aminoácido en la posición 57 y la presencia de arginina en la posición 52 de la cadena DQα permiten que un autoantígeno se acople en el sitio del HLA encargado de la presentación antigénica y el reconocimiento por el receptor de la célula T (13).

Otro sitio de susceptibilidad genético identificado es el IDDM2 que corresponde al gen de la insulina, el cuál se encuentra en el cromosoma 11. Este gen contribuye con aproximadamente el 10% de la agregación familiar de la enfermedad (14). Este locus corresponde a una región polimórfica que mapea para un número variable de repeticiones de secuencias de nucleótidos (en inglés VNTR). Los estudios han demostrado que diferentes tamaños de estos VNTRs del gen de la insulina están asociados con el riesgo de DMT1A. La forma más larga del VNTR (> 100 repeticiones o clase III), está asociado con protección para la enfermedad (15). Este hallazgo se ha explicado por una mejor tolerancia inmunológica a un gen de insulina más grande, con una mayor expresión a nivel tímico, y con su consecuente tolerancia.

Existen otros genes asociados con formas monogénicas de poliendocrinopatía (gen AIRE – autoimmune regulator-asociado con el síndrome poliendocrino autoinmune tipo 1 y el gen XPID), las cuáles incluyen dentro de sus manifestaciones la presencia de diabetes. Polimorfismos en el gen CTLA-4 (IDDM 12) están asociados con el desarrollo de enfermedad de Graves y aparentemente diabetes autoinmune, pero no en todas las poblaciones (16).

En resumen, muchos sitios genéticos han sido identificados como riesgo para el desarrollo de la diabetes. De ellos, la tipificación de HLA al nacimiento, está siendo utilizada en algunos proyectos de investigación para definir el riesgo de la patología, dependiendo de la relación que tenga este individuo con un caso índice de diabetes. Por ejemplo, los hermanos de pacientes con DMT1A que poseen el genotipo DR3-DQ2/DR4-DQ8 parecen tener un riesgo de diabetes que sobrepasa al 50% (17).

Aspectos ambientales

Diversas características hacen pensar en la DMT1A como una enfermedad con un importante componente ambiental. El rápido incremento en la incidencia, sumado a la variabilidad encontrada entre poblaciones genéticamente similares (por ejemplo el doble en incidencia en el Reino Unido comparado con Francia) sugieren que un agente ambiental pueda disparar la patología en diferentes países. Existen 2 hipótesis que pueden estar explicando el incremento reciente en la incidencia de la enfermedad. La primera de ellas es que un agente infeccioso, como un virus esté incrementándose en la población como causante de procesos infecciosos (18). La aparición mayor de la enfermedad en meses de invierno, el incremento en la incidencia y algunas epidemias de DMT1A, sugieren que ciertos virus como rotavirus (19) y Coxsackie virus (20) y algunos aspectos relacionados con la dieta pueden influir en el riesgo de presentar la patología. Se han descrito múltiples asociaciones con varios agentes ambientales y virales. Sin embargo, a pesar de más de tres décadas de investigación en este aspecto, la única asociación consistente con un agente viral es con la infección por rubéola congénita, y no en infecciones por rubéola no congénitas (21). Los niños con este tipo de diabetes usualmente poseen alelos HLA de alto riesgo y también altas prevalencias de enfermedades tiroideas autoinmunes (22, 23). La manera por la cuál la infección congénita por rubéola incrementa el desarrollo de la enfermedad es desconocida. Además, las asociaciones con un determinado agente viral se han basado en la determinación de anticuerpos o antígenos en el momento del diagnóstico. Debido a que la enfermedad se manifiesta clínicamente mucho tiempo después del inicio del proceso autoinmune, luego de una prolongada fase prodrómica, es difícil atribuir una relación patológica entre estos agentes infecciosos y la enfermedad. Esta situación, parece deberse a una presentación clínica precipitada por los mayores requerimientos de insulina en el curso de un proceso infeccioso, siendo la presencia de el agente infeccioso un hallazgo incidental.

Otro agente ambiental implicado en la patología ha sido la alimentación temprana con leche de vaca (albúmina sérica bovina-SBA-). Esta hipótesis se ha basado en resultados encontrados en estudios retrospectivos en los cuales se evidenciaba este factor (24). Diversos estudios prospectivos no han demostrado estos hallazgos. Entre ellos un reciente estudio realizado en Denver, Colorado, en el cuál se evaluaron niños desde su nacimiento, no mostró evidencia de asociación con la enfermedad de acuerdo a la alimentación con leche bovina, infecciones entéricas virales o antecedentes de vacunación (25).

Otro factor ambiental últimamente implicado son las toxinas de las bacterias Streptomyces que se encuentran en los suelos, y las cuales pueden colonizar alimentos como los vegetales. En este aspecto, se ha demostrado que algunas de estas toxinas pueden generar daños en las células pancreáticas en ratones (26).

La vacunación ha sido implicado como factor desencadenante de diabetes, en niños genéticamente susceptibles. Sin embargo, diferentes estudios no han confirmado esta tesis (27,28).

La segunda hipótesis, denominada "hipótesis de la higiene" indica que factores ambientales pueden inhibir el desarrollo de autoinmunidad. De una forma simple, el medio para los niños es hoy muy limpio, lo cual lleva a deficiencias en la inmunorregulación que pueden derivar en enfermedades con un patrón de respuesta Th2 (como

el asma), ó enfermedades caracterizadas por un patrón Th1, como la DMT1A (29,30). Otras observaciones sugieren el componente ambiental de la patología. Los hermanos no gemelos y los gemelos dicigóticos comparten el 50% de su material genético, a diferencia de los gemelos monocigóticos que comparten todo el genoma. Sin embargo, la concordancia de la enfermedad es mayor en los gemelos dicigóticos que en los hermanos no gemelos, sugiriendo un componente ambiental, debido a que los primeros están expuestos por lo general a los mismos estímulos ambientales (misma alimentación, infecciones, etc).

Aspectos inmunológicos: autoanticuerpos

Como se expuso anteriormente, más del 90% de los pacientes con DMT1A de reciente comienzo poseen al menos un autoanticuerpo dirigido contra componentes de los islotes. Una variedad importante de anticuerpos con especificidad contra constituyentes de las células β del páncreas han sido identificados, entre ellos la insulina, isoformas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD 65 y GAD 67), y la proteína secretora IA-2, que posee un dominio semejante a tirosin-fosfatasa. Estos autoanticuerpos son marcadores del proceso autoinmune más que los directos efectores del daño. Los anticuerpos contra GAD (GADA) se pueden detectar entre el 50 y el 80% de los pacientes caucásicos con diabetes de reciente diagnóstico (31,32). Esta positividad tiende a aparecer varios años antes del diagnóstico de la enfermedad y tiende a persistir en el suero de los pacientes por muchos años (33). La prevalencia de anticuerpos anti-IA-2 es aproximadamente del 65% (entre el 55 y 75%) y tiende a ser mayor en pacientes con diabetes de reciente comienzo, y de inicio temprano (preescolares) (34,35). Estos autoanticuerpos aparecen principalmente en paciente menores de 15 años de edad y por lo tanto son más útiles en el estudio de pacientes jóvenes con diabetes (36). Los anticuerpos antiinsulina, son los únicos autoanticuerpos específicos de autoinmunidad de las células β, encontrados principalmente en niños menores de 5 años (37). Sin embargo, un resultado negativo para estos autoanticuerpos no descarta el diagnóstico de DMT1A. La presencia de autoanticuerpos en familiares de pacientes con DMT1A o en población sana tienen un valor predictivo positivo importante para el desarrollo de la patología.

Patogénesis

El principal daño específico en esta patología es la destrucción selectiva de las células beta productoras de insulina en el páncreas, o insulitis (Figura 1). Diversos estudios han determinado que la presencia de autoanticuerpos en niños con DMT1A desde el nacimiento sugieren el desarrollo futuro de la enfermedad (38). Sin embargo, el rol de los autoanticuerpos en la patogénesis de la DMT1A no ha sido completamente dilucidado. De hecho, parecen ser un epifenómeno, secundario a la destrucción de las células beta mediadas en una mayor parte por inmunidad celular. Apoyando estos hallazgos, un reciente reporte de caso mostró el desarrollo de la patología en un paciente con agamaglobulinemia ligada al cromosoma X, sugiriendo que los autoanticuerpos no son necesarios para la progresión de la patología (39). En términos generales, la enfermedad es considerada como una enfermedad mediada por células T. Exámenes realizados en tejido pancreático confirman la insulitis, con la presencia de un infiltrado compuesto de linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y macrófagos, sugiriendo un papel de este grupo de células en la destrucción de las células beta (40) (Figura 2). Estudios previos han mostrado la utilidad del tratamiento en ratones con anticuerpos anti-CD3 como estrategia terapéutica para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Estudios utilizando este tipo de fármacos en humanos son objeto de investigación actual (41). En la Figura 3 se describe un modelo general que muestra el proceso de destrucción de las células β del páncreas desde su inicio hasta la presentación de la manifestación clínica. La interacción inicial de genes y factores ambientales parece disparar una respuesta mediada por el sistema inmune, con la aparición de diferentes autoanticuerpos como el primer signo de destrucción de la célula β, seguida eventualmente por la pérdida de la primera fase de la respuesta de insulina. La progresión a una diabetes clínica, es disparada por el desarrollo de un fenotipo de células T más agresivo y un cambio en el balance de Th1 a Th2, produciendo un fondo más inflamatorio. La expresión de moléculas Fas-FasLigando, en células T citotóxicas, también favorece la presentación clínica de la diabetes. La evaluación de los islotes durante la insulitis sugiere que la apoptosis mediada por Fas ocurre y proporciona un posible mecanismo de destrucción de las células β (42). Recientemente, una importancia creciente se está prestando en algunos subgrupos de células T reguladoras, las cuáles han mostrado capacidad para controlar el desarrollo de la patología tanto en ratones NOD (en inglés, nonobese diabetic mouse), y ratas BioBreeding (BB) (los dos modelos animales de la enfermedad más estudiados) (43,44). Tres grupos principales de células T han sido descritos: células Th2, que aparecen después de la administración de autoantígenos de células β solubles, células T $CD4^+$ $CD25^+$ (células T reguladoras), y células asesinas naturales (Natural Killer),

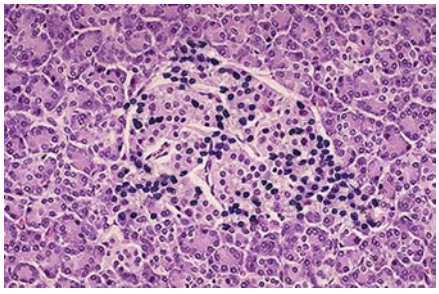


FIGURA 1.
Histología de la insulitis.
Un islote de Langerhans muestra el desarrollo de insulitis con la presencia de infiltrado linfocitario.

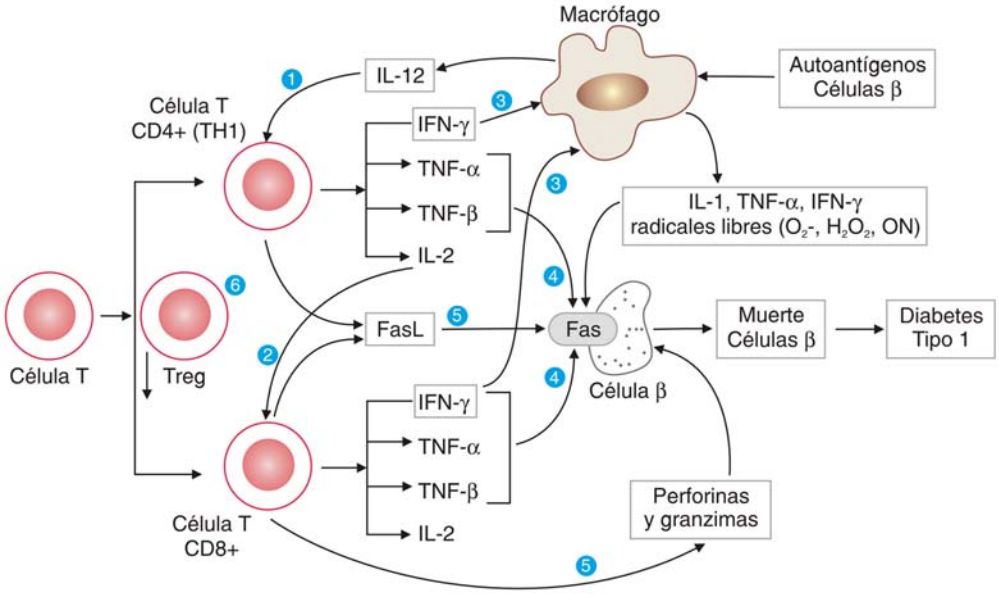


FIGURA 2.

Representación esquemática de la colaboración entre macrófagos y células T en la destrucción de las células β del páncreas.

Los autoantígenos de las células β podrían ser liberados de las células β durante un recambio espontáneo de estas células. Los antígenos son luego procesados por macrófagos y presentados a células T ayudadoras en conjunto con moléculas de Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II. Los macrófagos activados pueden secretar Interleuquina (IL)-12, que activa a las células T $CD4^+$ tipo Th1 (1). Las células $CD4^+$ secretan citoquinas como IFN-γ (interferon-gama), TNF-α (factor de necrosis tumoral), TNF-β e IL-2. Mientras este proceso se está llevando a cabo, células T precitotóxicas específicas contra las células β del páncreas son reclutadas hacia los islotes. Estas células T precitotóxicas pueden ser activadas por la IL-2 y otras citoquinas liberadas por las células T $CD4^+$ para diferenciarse en células $CD8^+$ efectoras (2). El IFN-γ liberado por las células T ayudadoras y citotóxicas puede llevar a los macrófagos a convertirse en citotóxicos (3). Estos macrófagos citotóxicos liberan importantes cantidades de citoquinas tóxicas para las células β (entre ellas IL-1β, TNF-α, e IFN-γ) y radicales libres (ON-óxido nítrico-, H_2O_2 – peróxido de Hidrógeno-). Las citoquinas liberadas de los macrófagos y las células T pueden inducir la expresión de Fas en las células pancreáticas (4). Las células β son destruidas por apoptosis mediada por Fas (4) y/o granzimas y perforinas, las cuáles son tóxicas para las células β (5). Las células T reguladoras pueden prevenir o retardar el desarrollo de la patología, suprimiendo las funciones efectoras de las células T. Sumado a esto diversas citoquinas con características anti-inflamatorias e inmunorreguladoras, pueden alterar el desarrollo del proceso autoinmune (6), como la IL-10 , IL-4 y TGF- β (factor de crecimiento y transformación β).

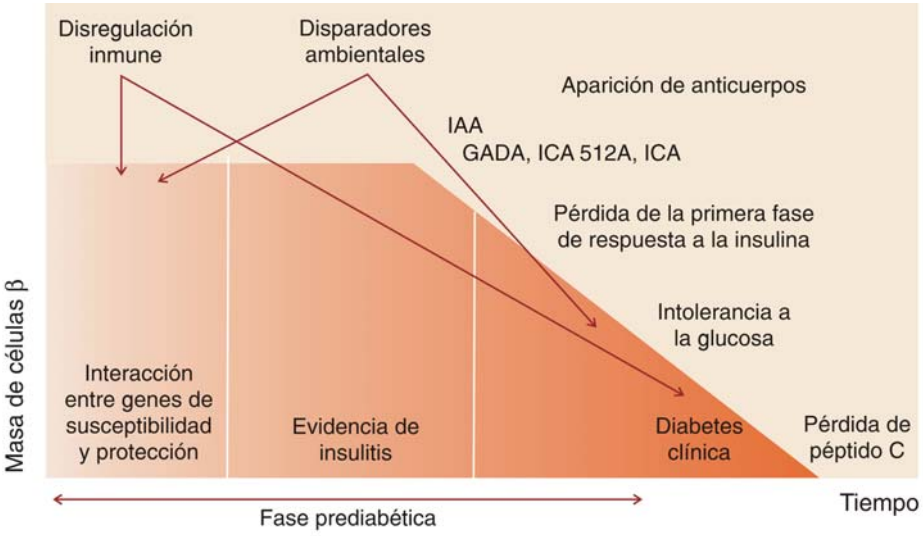


FIGURA 3.

Modelo de patogénesis e historia natural de la diabetes tipo 1.

(Disponible en: Eisxenbarth GS, ed. Type 1A diabetes: cellular, molecular and clinical immunology, teaching slides www.barbaradavis center.org).

GADA: Anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico; ICA 512: Anticuerpos contra el antígeno 512 o IA-2; ICA: anticuerpos anti-islotes.

que probablemente aparecen de forma espontánea durante la ontogenia. No es claro cómo actúan para evitar o retardar el desarrollo de la diabetes, pero este aspecto está siendo estudiado actualmente como posibles intervenciones. El papel de diferentes citoquinas tanto proinflamatorias como anti-inflamatorias se está estudiando en la enfermedad, con el fin de convertirse en posibles blancos terapéuticos. Un gran número de citoquinas están involucradas en la diferenciación y activación de las células T que contribuyen a la patogénesis de la DMT1A. De esta manera se ha demostrado la utilidad del bloqueo de citoquinas patogénicas como IFN-γ (interferon-gama), receptor de IL-2 (IL: interleuquina) o IL-12. También se ha demostrado prevención en animales, con bloqueo de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF-α. El uso de citoquinas con propiedades regulatorias, como IL-4, IL-10 e IL-13 entre otras han mostrado utilidad en retardar la progresión de la patología (43).

Presentación clínica

El pico de presentación de la enfermedad es alrededor de la pubertad. Los síntomas y signos están relacionados con la presencia de hiperglicemia y los efectos resultantes del disbalance en líquidos y electrolitos. Estos síntomas generalmente incluyen poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Debido a que algunos cuadros infecciosos pueden precipitar la presentación inicial, los síntomas de infecciones como fiebre, odinofagia, tos o disuria, entre otros pueden estar presentes. El comienzo de los síntomas puede ser de corta evolución, principalmente cuando se manifiesta como cuadro de cetoacidosis, aunque puede ser insidioso. Cuando el cuadro comienza con cetoacidosis, se presentan manifestaciones diversas como dolor abdominal, náuseas y vómito. También se pueden presentar alteraciones variables en el estado mental, desde una leve alteración hasta un coma profundo.

Hallazgos de laboratorio

Los niveles plasmáticos de glucosa en el momento de la presentación del cuadro se encuentran elevados con rangos variables (generalmente mayor de 250 mg/dL -14 mmol/L-). Si la presentación clínica no es complicada, los parámetros de líquidos y electrolitos pueden ser completamente normales. Por otra parte, si se presenta cetoacidosis diabética, se reflejan en los exámenes acidosis y deshidratación. En estos pacientes, el sodio sérico usualmente está en el límite inferior de lo normal, o se encuentra realmente disminuido, reflejando el efecto osmótico de la hiperglicemia. A pesar de una pérdida significativa de potasio en la orina y déficit del potasio corporal total, la presencia de acidosis usualmente lleva a una elevada concentración de potasio sérico en el momento de la presentación. Las concentraciones de bicarbonato sérico son usualmente menores de 15 mEq/L. También se presenta elevación de cuerpos cetónicos (mayor de 300 mmol/L). Debido a la deshidratación, se produce un incremento en las concentraciones de nitrógeno ureico y de creatinina.

Predicción de la enfermedad

La prolongada fase prodrómica que precede el comienzo de los síntomas sugiere un potencial para predecir la enfermedad y diseñar estudios para su prevención. El desarrollo de la DMT1A en familiares de los pacientes puede ahora predecirse con relativa certeza mediante la determinación de los autoanticuerpos contra islotes pancreáticos. La detección de 2 o más autoanticuerpos (GADA, IA-2 o antiinsulina) en familiares de pacientes con DMT 1A tienen un valor predictivo positivo superior al 90% (45). Los anticuerpos antiinsulina son los más comúnmente encontrados, especialmente en pacientes jóvenes. Aunque la mayoría de los estudios de predicción determinando autoanticuerpos se han enfocado principalmente en familiares de primer grado de pacientes con diabetes, la predicción de múltiples autoanticuerpos relacionados con la enfermedad parece tener el mismo significado en la población general (46). Aunque se puedan realizar predicciones exitosas de la enfermedad mediante la medición de los autoanticuerpos, un método adecuado de prevención no se ha descubierto aún. Sin embargo, en el estudio DAISY, el cuál evaluó niños con alto riesgo y autoanticuerpos positivos (sin ninguna intervención), se encontró una menor incidencia de cetoacidosis al comienzo de la patología, mejores niveles de hemoglobina glicosilada al inicio, y menor número de hospitalizaciones debido a su seguimiento clínico más estrecho (47). Este estudio sugiere entonces, que a pesar de no poder realizar medidas preventivas en los pacientes de alto riesgo, un seguimiento clínico más estrecho favorecería una mejor evolución clínica, entre tanto se disponga de medidas preventivas eficaces.

El uso de los autoanticuerpos se ha extendido para subdividir pacientes catalogados previamente como diabéticos tipo 2. Los resultados del estudio de diabetes prospectivo del Reino Unido (UKPDS) indican que al menos el 30% de los pacientes jóvenes con "diabetes tipo 2", presentan un proceso autoinmune, y que en el transcurso de tres años, estos pacientes progresan a necesitar insulina (Figura 4) (48). Este subgrupo de pacientes se ha denominado diabetes autoinmune latente del adulto (en inglés LADA).

Prevención y nuevos tratamientos

Prevención

Hasta la fecha ningún tratamiento ha mostrado prevenir la DMT1A en humanos. Más de 100 tratamientos diferentes pueden prevenir la enfermedad en el ratón no obeso (NOD), indicando que la prevención en este modelo animal es muy fácil (49) (Tabla 8). Dos estudios importantes se han llevado a cabo para estudiar la prevención en DMT1A. En los Estados Unidos, el estudio de prevención de la diabetes (DPT-1) se inició en 1994 con el objetivo de determinar si un régimen basado en el antígeno (insulina), tanto oral como parenteral, en familiares con alto o moderado riesgo, prevendría o retrasaría

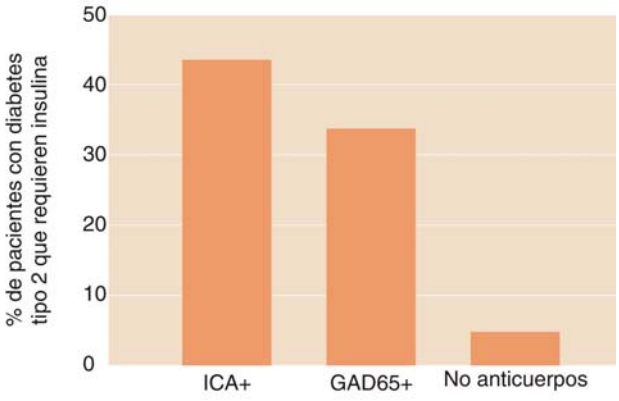


FIGURA 4.
Diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) en un estudio prospectivo realizado en el Reino Unido.
Porcentaje de pacientes jóvenes con diabetes tipo 2 (entre 25 y 34 años) con anticuerpos antiislotes (ICA) y contra descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) con necesidad de insulina a los seis años del diagnóstico. Adaptado de Turner et al (48).

el desarrollo de la diabetes. Estos tratamientos en general, no retrasaron el desarrollo de la patología. El estudio europeo de intervención con nicotinamida (ENDIT) tampoco encontró diferencia en la protección para la enfermedad cuando los participantes fueron asignados ya fuera a nicotinamida oral o placebo. Los primeros estudios de terapias utilizadas para prevenir la destrucción de las células beta del páncreas se basaron en terapias inmunosupresoras. Estudios realizados con ciclosporina indicaron que mientras este medicamento era administrado se prevenía pérdidas posteriores de células beta y se mejoraba la función metabólica (50-52). Sin embargo si la terapia se instauraba posterior al desarrollo clínico de la diabetes los beneficios de la terapia eran mínimos y transitorios. La incapacidad de la terapia para "curar" la diabetes y los altos efectos tóxicos derivados de esta (en particular nefrotoxicidad y aumento en el riesgo de malignidad) ha descartado su uso clínico con este fin. Otras terapias inmunosupresoras como prednisolona o azatioprina han tenido relativamente pocos efectos (53,54). Estudios con metotrexate no han mostrado utilidad (55). Así, hasta la fecha, aunque la diabetes es una enfermedad mediada por el sistema inmune, no es tratada con los agentes inmunomoduladores o supresores actuales. Debido a lo anterior, estudios encaminados a la protección con diferentes terapias son necesarios y muchos de ellos ya están en curso. Un estudio piloto con un anticuerpo específico contra el receptor CD3 ha sido reportado y estudios mayores se están realizado (41). Como se mencionó anteriormente, al menos 100 terapias han mostrado ser efectivas en la prevención o tratamiento de la enfermedad en los ratones NOD. Estas terapias se resumen en la Tabla 9 (43).

TABLA 8. **Modelos animales de diabetes autoinmune.**

	Nombre	Características	Prevención	Comentarios
Espontáneos				
	Ratones NOD: poligénicos	Bases genéticas similares a las humanas dependientes de HLA. Más de 15 genes diferentes incrementan la susceptibilidad. A diferencia de la DMT1A humana, en este modelo se afectan más las hembras que los machos. Producen anticuerpos antiinsulina antes del desarrollo clínico de la patología.	Más de 100 terapias previenen el desarrollo de la patología en los ratones NOD. Entre ellas la nicotinamida, vacunación con insulina o GAD.	Es el modelo animal más estudiado de la patología.
	Ratas BB (BioBreading rat): oligogénicas	Las ratas susceptibles poseen una mutación autosómica recesiva que los lleva a una linfopenia severa. También existe un componente genético en alelos HLA, principalmente el RT1-U. Sin embargo el número de genes implicados es menor que en ratones NOD.	La prevención es más difícil que en los ratones NOD. Por ejemplo la intervención con insulina puede prevenir la patología pero se necesitan dosis mucho mayores que son hipoglicemiantes.	Primer modelo animal de la patología estudiado.
	Ratas Long-Evans Tokushima Lean (LETL)	Similar a las ratas BB. Posee el alelo RT1-U y una herencia oligogénica.		
Inducidos				
		Cepas de ratones padecen diabetes inducidas por drogas como estreptozotocina.		A altas dosis induce rápidamente la patología. A bajas dosis induce una instalación crónica.
		Copolímeros de ácido poliinosínico y policitidílico, inducen diabetes en cepas con mutaciones en el gen RT1-U.		Este copolímero induce la producción de interferon α.

NOD: en inglés, *non obese diabetic mouse* (ratones diabéticos no obesos); DMT1A: diabetes mellitus autoinmune; GAD: descarboxilasa del ácido glutámico.

Tabla 9. Agentes usados para la prevención o tratamiento de la diabetes en ratones NOD.

1. Depleción de células T o secuestro
   - 1.1 Depleción
     - Anti-CD3
     - Anti-CD4
     - Anti-CD8
     - Anti-CD44
     - Anti-CD45RA
     - Anti-CD45RB
     - Anti-Thy 1.2
     - Globulina antilinfocito
     - Timectomía neonatal
   - 1.2 Secuestro
     - Anti-CD43
     - Anti-VLA-I
     - Anti-VLA-4
     - VLA-4/Ig proteína de fusión
     - Anti-CD62L

2. Bloqueo de la activación de células T
   - 2.1 Inmunosupresores químicos
     - Ciclosporina A
     - FK-506
     - Azatioprina
     - Rapamicina
     - Deoxispergualina
   - 2.2 Irradiación γ

3. Ataque en receptores de células T
   - 3.1 Anticuerpos TCRαβ
   - 3.2 Anticuerpo anti-CD3
   - 3.3 Anticuerpo Vβ8
   - 3.4 Vacunación con células T
     - Células T activadas policlonales
     - Células T tratadas con glutaraldehido
     - Células T activadas
     - Células T Vβ8
     - Clon de células T anti-hsp60
   - 3.5 Bloqueo de péptidos

4. Moléculas de MHC como blanco
   - 4.1 Anti-clase I
   - 4.2 Anti-clase II
   - 4.3 Ratones transgénicos MHC
     - Clase I
     - I-A
     - I-E

5. Moléculas de adhesión y coestimulación como blancos
   - 5.1 Moléculas de coestimulación
     - Anti-CD28
     - CTLA4-Ig proteína de fusión
     - Anti-B7.2
     - Anti-CD40L
   - 5.2 Moléculas de adhesión
     - Anti-ICAM1
     - ICAM-1 soluble
       - Proteína recombinante
       - Terapia génica
     - Anti-Mac
     - Anti-LFA

6. Bloqueo de citoquinas
   - 6.1 IFN-γ
     - Anti-IFN-γ
     - IFN- γR/IgG1 proteína de fusión
   - 6.2 IL-2
     - Anti-IL-2R
     - IL-2R/Ig proteína de fusión
     - IL-2 proteína tóxica de la difteria
   - 6.3 IL-12
     - Anti-IL-12
     - Antagonista de la IL-12
   - 6.4 IFN-α (oral)
   - 6.5 IL-1
     - Anticuerpos anti-IL-1
     - Antagonista de IL-1
   - 6.6 IL-6
   - 6.7 Receptor de linfotoxina

7. Citoquinas farmacológicamente activas
   - 7.1 IL-4
   - 7.2 IL-10
   - 7.3 IL-13
   - 7.4 IL-3
   - 7.5 G-CSF
   - 7.6 Linfotoxina
   - 7.7 IL-11
   - 7.8 IL-1α
   - 7.9 TNF-α

8. Tolerancia a autoantígenos solubles de células B
   - 8.1 Insulina
     - Oral
     - Oral + IL-10
     - Intranasal
     - Subcutánea
       - Proteína completa
       - Cadena B
       - Análogo inactivo
     - Vacunación con DNA
     - Entrega de genes de transferencia (proinsulina)
     - Conjugado toxina colérica
   - 8.2 Descarboxilasa del ácido glutámico
     - Oral
     - Intranasal
     - Subcutáneo
     - Intratímico
     - Vacunación con DNA
     - Anticuerpos anti-GAD
   - 8.3 Proteína choque térmico 60 (hsp 60)
     - Subcutánea o intraperitoneal
       - Proteína
       - Péptido P277
     - Entrega de genes de transferencia
   - 8.4 Extractos pancreáticos (oral)

9. Estimulación de células T reguladoras
   - 9.1 Patógenos
     - Bacterias
       - Micobacterias
         - Mycobacterium bovis
         - M.avium
         - Adyuvante completo de Freund
       - Lactobacillus casei
       - Extractos de Streptococcos
       - Extractos de Klebsiella
       - E. coli (+ insulina oral)
     - Virus
       - Virus de la hepatitis del ratón
       - Virus lactato deshidrogenasa
       - Virus de la coriomeningitis linfocítica
     - Parásitos
       - Filaria
       - Esquistosomas
   - 9.2 Estimulación de la inmunidad innata
     - α-galactosilceramida
   - 9.3 Anticuerpos contra células B no depletantes
     - Anti-CD3
     - Anti-CD4
     - Superantígenos

10. Terapia génica
    - 10.1 Antígenos de las células β
      - Vacunación con DNA
      - Inmunoglobulina GAD
    - 10.2 IL-4
      - Retrovirus (transfección de células T)
      - Biolistic
      - Adenovirus
      - IL-4/IgG1 proteína de fusión
    - 10.3 IL-10
      - Transfección de células T
      - Local
      - Sistémica
    - 10.4 ICAM-1
    - 10.5 IFN-γR/IgG1 proteína de fusión
    - 10.6 TGF-β
    - 10.7 Calcitonina

11. Terapia celular
    - 11.1 Trasplante de islotes o segmentario del páncreas
      - Singénico
      - Alogénico (+ inmunosupresión)
    - 11.2 Trasplante de islotes intratímicos
    - 11.3 Trasplante de médula ósea
      - Alogénico
      - Singénico
    - 11.4 Células dendríticas
    - 11.5 Células asesinas naturales
    - 11.6 Líneas celulares CD4
      - Policlonal
      - Anti-Iag[7]
    - 11.7 Células alogénicas
      - Macrófagos
      - Células del bazo

12. Inhibición de la lesión en células β
    - 12.1 Nicotinamida
    - 12.2 Antioxidantes
      - Vitamina E
      - Análogos del Probucol
      - Probucol + deflazacort
      - Aminoguanidina
    - 12.3 Agentes antiinflamatorios
      - Pentoxifilina
      - Rolipram

13. Misceláneos
    - 13.1 Inmunomoduladores
      - Linomide
      - Ling-zhi-8
      - D-Glucan
      - Proteína multifuncional 14
      - Ciamexon
      - Toxina colérica B
      - Vanadato
      - Análogos de la Vitamina D
    - 13.2 Hormonas y proteínas relacionadas
      - Andrógenos
      - IGF-1
    - 13.3 Inmunomanipulacíon
      - Anticuerpos naturales
      - Idiotipo lupus
      - Lipopolisacárido
    - 13.4 Dieta
      - Hidrosilato de caseina
    - 13.5 Otros
      - Sulfatide
      - Veneno de abeja
      - Fórmula Kampo
      - Silica
      - Ganglióside
      - Anticuerpo antiasialo GM-1
      - Hialorunidasa
      - Concanavalina A

VLA: en inglés, very late antigen; FK-506: tacrolimus; TCR: receptor de linfocito T; V: región variable de Inmunoglobulinas; hsp: proteínas de choque térmico; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular-1; IFN: Interferon; Ig: Inmunoglobulina; IL: Interleuquina; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; TNF: factor de necrosis tumoral; DNA: ácido desoxirribunucleico; GAD: descarboxilasa del ácido glutámico; TGF-β; factor transformador del crecimiento beta.
Adaptado de Referencia 43.

Tabla 10. Metas de control de la glicemia en individuos con diabetes no embarazadas*.

Valores	Normal	Meta	Acción adicional sugerida†
Valores plamáticos ‡			
Promedio glucosa preprandial (mg/dL)	<110	90–130	<90/>150
Promedio glucosa postprandial (mg/dL)	<140	110-180	<110/>180
Promedio glucosa al acostarse (mg/dL)	<120	110–150	<110/>180
Valores sanguíneos totales §			
Promedio glucosa preprandial (mg/dL)	<100	80–120	<80/>140
Promedio glucosa postprandial (mg/dL)	<140	110-180	<110/>180
Promedio glucosa al acostarse (mg/dL)	<110	100–140	<100/>160
Hemoglobina A_{1c} (%)	<6	<7	>8

* Los valores mostrados en la tabla son generalizados a todos los individuos con diabetes. Los pacientes con enfermedades comórbidas, o pacientes en los extremos de la vida, y otros con condiciones inusuales pueden requerir diferentes metas del tratamiento. Estos valores son para pacientes adultos no embarazadas.
† Los valores por encima o debajo de las metas no son ideales, y no deben ser aceptados para la mayoría de los pacientes. Estos indican la necesidad de un cambio en el plan de tratamiento. Acciones adicionales son sugeridas dependiendo de las circunstancias individuales de cada paciente. Estas acciones pueden incluir mejorías en la educación, manejo por un equipo interdisciplinario, remisión a un endocrinólogo, cambio en la terapia, inicio o incremento en el automonitoreo de la glicemia, o un contacto más frecuente con el paciente.
‡ Los valores son estandarizados para la glucosa plasmática.
§ Medidas de glucosa en sangre capilar.
Modificado de Referencia 69.

Vacunación

En modelos animales se han utilizado múltiples terapias para prevenir el desarrollo de la diabetes. La vacunación inmunológica es una estrategia llamativa, principalmente por su especificidad y bajo riesgo comparado con la inmunosupresión convencional. El concepto básico es la inducción de linfocitos que reconocen un antígeno dado de los islotes, y una vez realizado este reconocimiento, se genera la producción de citoquinas que suprimen la autoinmunidad y la destrucción tisular (56,57). Los linfocitos T Th2 producen más interleuquina 4 (IL-4) que interferon gama o IL-2 (producidas por células Th1) y disminuyen la destrucción mediada por células. La inducción de la respuesta inmune protectora puede depender de la ruta de administración del antígeno dado (ej. tolerancia oral) o a la utilización de antígenos alterados. Por ejemplo, la insulina oral o subcutánea previene el desarrollo de diabetes en los ratones NOD (58,59). Sin embargo, no se necesita la insulina intacta para generar esta respuesta (60).

Tratamiento

La insulina se mantiene como el principal tratamiento para los pacientes con DMT1A. El estudio DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), demostró la importancia de un estricto control metabólico con el fin de retrasar y prevenir la aparición de las complicaciones derivadas de la diabetes (61). Sin embargo, el riesgo de inducir hipoglicemia durante el tratamiento, es aún la mayor limitante para alcanzar un adecuado control metabólico. La introducción de análogos de insulina rápidamente absorbidos ha reducido la variabilidad en la absorción de ésta permitiendo la administración incluso en el momento de las comidas (62). Otro reciente producto comercializado es la insulina glargina, que funciona como una insulina de muy larga acción, con un comportamiento semejante a la secreción de insulina basal y sin la presencia de picos (63). Combinaciones de insulinas de muy larga acción, con otras de rápida acción pueden proporcionar un control y manejo similar al que se obtiene con las bombas de insulina. En las Tablas 10 y 11 se presentan las principales metas del tratamiento con insulina, derivados de una terapia intensiva y las presentaciones farmacológicas disponibles de la misma.

El uso de la metformina sumado a la insulina, se ha incrementado en pacientes con DMT1A. Estudios recientes han sugerido que la metformina podría beneficiar a los pacientes con DMT1A que padecen sobrepeso, están recibiendo altas dosis de insulina o poseen HbA1c mayores de 8% (64). La coexistencia de resistencia a la insulina en pacientes con DMT1A es un área de reciente interés, anteriormente aplicable sólo en la diabetes tipo 2. El trasplante de islotes pancreáticos sumado a una terapia inmunosupresora adecuada pueden eventualmente curar

Tabla 11. Propiedades farmacocinéticas de las diferentes preparaciones de insulina.

Preparación	Comienzo de acción	Pico	Duración
Acción rápida			
Regular	½–1 hr	2–4 hr	6–8 hr
Lispro	15 min	1 hr	3–4 hr
Aspartato	15 min	1 hr	3–4 hr
Acción intermedia			
NPH	1–3 hr	6–8 hr	12–16 hr
Lenta	1–4 hr	6–10 hr	14–18 hr
Acción lenta			
Ultralenta	2–4 hr	8–10 hr	16–24 hr
Glargina	6 hr	Actividad sin pico, mayor de 24 horas	

NPH: neutral protamine Hagedorn.

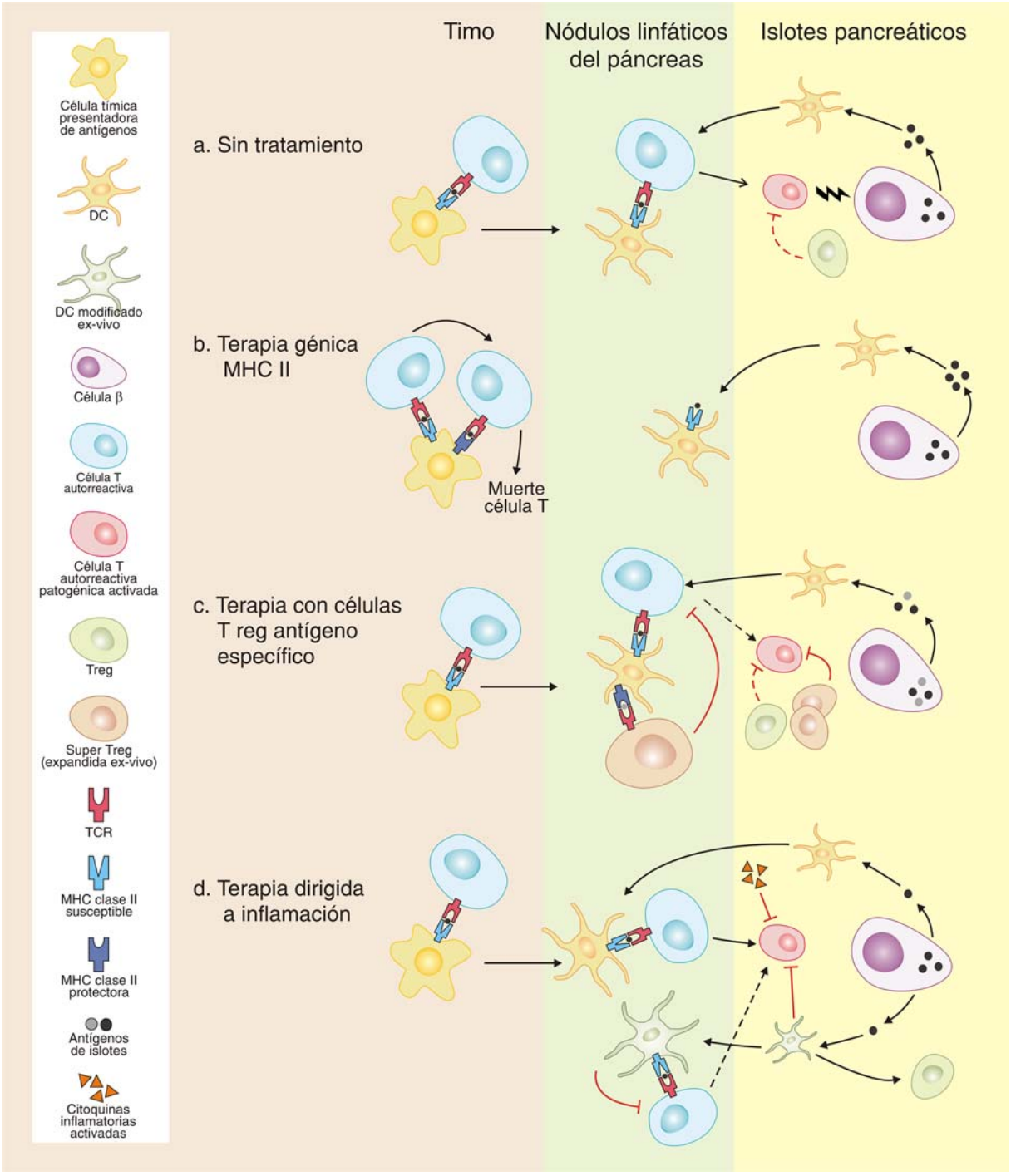


FIGURA 5.

Terapia génica en Diabetes Mellitus tipo 1A.

a. Debido a varios efectos combinados, las células T autorreactivas en los ratones NOD escapan la selección negativa que se lleva a cabo en el timo y se convierten en células activadas en los nódulos linfáticos del páncreas. Las células T efectoras resultantes son controladas durante un periodo limitado (resultando en peri-insulitis) hasta que la regulación (que involucra principalmente a las células T reguladoras) no es suficiente, y se desarrolla el proceso de la diabetes. b. En ratones NOD irradiados, que expresan una forma de CMH clase II protectora, las células T autorreactivas son eficientemente eliminadas en el timo y no se observa insulitis. c. Las células T reguladoras específicas de antígenos de islotes pueden aislarse y proliferar ex vivo. Cuando se reintroducen, estas células prueban ser eficientes supresoras tanto en los nódulos linfáticos y en las lesiones pancreáticas. d. Las células dendríticas (DC) o células T específicas de antígenos pueden aislarse y modificarse ex vivo para expresar: (a) proteínas inmunorregulatorias que inducen tolerancia, apoptosis o desviación inmune de células T autorreactivas; y (b) receptores apropiados para aumentar su tránsito en sitios de inflamación. De forma alternativa, las citoquinas inhibidoras que han sido modificadas por ingeniería, para activarse sólo bajo condiciones inflamatorias se pueden inyectar. Estas dos estrategias favorecen la acción local más que sistémica de los productos inhibidorios. Adaptado de Referencia 68.

TCR: receptor de linfocito T; Treg: células T reguladoras; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; Célula β: célula beta del páncreas.

la diabetes. Este trasplante es considerado para el limitado pero importante grupo de pacientes con episodios recurrentes severos de hipoglicemia que no responden al manejo médico de forma adecuada (65). La incapacidad para controlar la autoinmunidad y la aloinmunidad, sumado a la falta de órganos donantes, limitan una mayor aplicación de los trasplantes de islotes.

Otras estrategias de trasplante sumado al trasplante de islotes, es el trasplante de médula ósea. Este trasplante tanto alogénico como singénico puede ser útil en el control o prevención de la patología, probablemente a través de la producción de citoquinas inmunorreguladoras y producción de mecanismos reguladores que sobrepasen a los mecanismos efectores (66-67).

La terapia génica puede utilizarse de muchas maneras para prevenir o curar la diabetes. Se puede realizar terapia génica basada en insulina u otras estrategias terapéuticas. Además, se ha realizado terapia génica en el sistema inmune, en varias líneas de investigación. Una posible intervención es el desarrollo o sobreexpresión de citoquinas o receptores, con el fin de realizar los efectos farmacológicos de cada una de ellas. Entre ellos, se han realizado experimentos con liberación de citoquinas intraislotes y de forma sistémica. Se han usado varios vectores (tanto virales como no virales) para este tipo de investigación, en la cuál el uso de IL-4, la proteína de fusión IL-4-Ig, IL-10, el receptor de IFN-γ y el TGF-β (factor de crecimiento y transformación β) han protegido a los ratones del desarrollo de la patología (68) (Figura 5).

Referencias

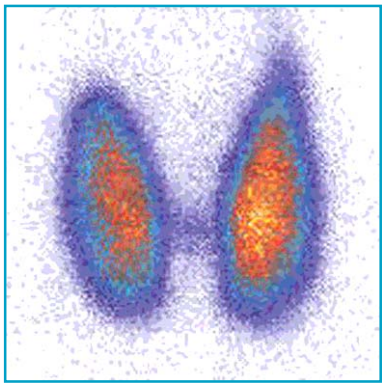
1. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20; 1997; 1183-1197
2. Knip M. Disease-associated autoimmunity and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. Ann Med 1997; 29: 447-451
3. Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in type I (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 1999; 42:3–14
4. Carreras G, Mauricio D, Perez A, de Leiva A. Can all newly diagnosed subjects without type 1 diabetes-associated autoimmune markers be classified as type 1b diabetic patients? Diabetes Care 2000; 23: 1715-1716
5. Decochez K, Tits J, Coolens JL, et al. The Belgian Diabetes Registry: High frequency of persisting or increasing islet-specific autoantibody levels after diagnosis of type 1 diabetes presenting before 40 years of age. Diabetes Care 2000; 23: 838-844
6. Tiberti C, Buzzetti R, Anastasi E, et al. Autoantibody negative new onset type 1 diabetes lacking high risk HLA alleles in a Caucasian population: are these type 1b diabetes cases? Diabetes Metab Res Rev 2000; 16: 8-14
7. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes- the analysis of the data on published incidence trends. Diabetologia 1999; 42: 1395-1403
8. Molbak AG, Christau B, Marner B, Borch-Johnsen K, Nerup J. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark. Diabet Med 1994; 11: 650-655
9. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, La Porte R, Toumilehto J. Incidence of Childhood Type 1 Diabetes Worldwide. Diabetes Care 2000; 23: 1516-1526
10. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. Lancet 2000; 355: 873-876
11. Devendra D, Eisenbarth GS. Immunologic endocrine disorders. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 624-636
12. Redondo MJ, Rewers M. Yu L, et al. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1A diabetes: prospective twin study. BMJ 1999; 318: 698-702
13. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001; 358: 221-229
14. Bernnett ST, Todd JA. Human type 1A diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. Annu Rev Genet 1996; 30: 343-370
15. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 19997; 15: 289-292
16. Larsen ZM, , Kristiansen OP, Mato E, et al. IDDM12 (CTLA4) on 2q33 and IDDM13 on 2q34 in genetic susceptibility to type 1 diabetes (insulin-dependent). Autoimmunity 1999; 31:35–42
17. Eisenbarth GS, Elsey C, Yu L, Rewers M. Infantile anti-islet autoimmunity: DAISY study (abstract). Diabetes 1998; 47:A210
18. Hyoty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. Diabetologia 2002; 45: 1353-1361
19. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins A. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. N Engl J Med 1979; 300:1173–1179
20. Nigro G, Pacella ME, Patane E, Midulla M. Multi-system coxsackie virus B-6 infection with findings suggestive of diabetes mellitus. Eur J Pediatr 1986; 145:557–559
21. Robles DT, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes induced by infection and immunization. J Autoimmun 2001; 16:355–362
22. Shaver KA, Boughman JA, Nance WE. Congenital rubella syndrome and diabetes: a review of epidemiologic, genetic, and immunologic factors. Am Ann Deaf 1985; 130:526–532
23. Rubenstein P. The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. Diabetes 1982; 31:1088–1091
24. Akerblom HK, Savilahti E, Saukkonen TT, et al. The case for elimination of cow's milk in early infancy in the prevention of type 1 diabetes: the Finnish experience. Diabetes Metab Rev 1993; 9:269–278
25. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and B-cell autoimmunity: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). JAMA 1996; 276: 609-614
26. Myers MA, Hettiarachchi KD, Ludeman JP, Wilson AJ, Wilson CR, Zimmet PZ. Dietary microbial toxins and type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci 2003;1005:418-422
27. Karvonen M, Cepaitis Z, Tuomilehto J. Association between type 1 diabetes and *Haemophilus influenzae* type b vaccination: birth cohort study. BMJ 1999; 318:1169–1172
28. Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood vaccination and type 1 Diabetes. N Engl J Med 2004; 350: 1398-1404
29. Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis? Diabetologia 2002; 45: 588-594
30. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med 2002; 347: 911-920
31. Hagopian WA, Sanjeevi SA, Kockum I, et al. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cellantibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. J Clin Invest 1995; 95:1505–1511
32. Velloso LA, Kampe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlson GA. Demonstration of Gad-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type I diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. J Clin Invest 1993; 91:2084–2090
33. Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 1993; 91:350–356
34. Nishino M, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al. Polymorphism in gene for islet autoantigen, IA-2, and type 1 diabetes in Japanese subjects. Human Immunol 2001; 62: 518–522

35. Chang YH, Shiau MY, Tsai ST, Lan MS. Autoantibodies against IA-2, GAD, and topoisomerase II in type 1 diabetic patients. Biochem Biophys Res Commun. 2004 30;320:802-809
36. Hermitte L, Atlan-Gepner C, Mattei C, et al.. Diverging evolution of anti-GAD and anti-IA-2 antibodies in long-standing diabetes mellitus as a function of age at onset: no association with complications. Diabetes Med 1998;15: 586–591
37. Verge C, Howard N, Rowley M, Mackay I, Zimmet P. Antiglutamate decarboxylase, and other antibodies at onset of childhood IDDM: a population-based study. Diabetologia 1994; 37: 1113-1120
38. Yu L, Robles DT, Abiru N, et al. Early expression of anti-insulin autoantibodies of man and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 1701-1706
39. Martín S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. N Engl J Med 2001; 345: 1036-1040
40. Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N, et al. Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycaemic control in patients with recent-onset type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1999; 42: 574-578
41. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1A diabetes mellitus. N Engl J Med 2002; 346: 1692-1698
42. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richomond JA, Weir RS. The histopathology of the pancreas in type I diabetes (insulin dependent) mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. Diabetologia 1986; 29: 267-274
43. Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. Arthritis Res 2002, 4 (Suppl 3): S3-S15
44. Alyanakian MA, You S, Damotte D, et al. Diversity of regulatory $CD4^+$ T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 15806-15811
45. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes 1996; 29: 267-274
46. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, et al. Successful prospective prediction of type 1A diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State diabetes prediction study. Diabetes Care 20002; 25: 505-511
47. Barker J, Klingensmith G, Barriga K, Rewers M. Clinical characteristics of type 1 diabetic children identified by a genetic screening and intensive follow-up program. Diabetes 2003; 52 (suppl 1): A 188
48. Turner R, Stratton I, Horton V, et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. Lancet 1997; 350: 1288-1293
49. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1A diabetes: as good as it gets? Nat Med 1999; 5: 601-604
50. Assan R, Feutren G, Debray-Sachs M, et al. Metabolic and immunological effects of cyclosporine in recently diagnosed type I diabetes mellitus. Lancet 1985; 1:67–71
51. Chase HP, Butler-Simon N, Garg SK, et al. Cyclosporine A for the treatment of new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. Pediatrics 1990; 85:241–245
52. Stiller CR, Dupre J, Gent M, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. Science 1984; 223:1362–1367.
53. Cook JJ, Hudson I, Harrison LC, et al. Double-blind controlled trial of azathioprine in children with newly diagnosed type I diabetes. Diabetes 1989; 38:779–783
54. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1988; 319: 599–604
55. Buckinghan BA, Sandborg CI. A randomized trial of methotrexate in newly diagnosed patients with type 1 diabetes mellitus. Clin Immunol 2000; 96:86–90
56. Weiner HL, Miller A, Khoury SJ, et al. Suppression of organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Proceedings of the 8th International Congress on Immunology, 1992, pp 627–634
57. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, et al. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. J Clin Invest 1995; 95:628–634
58. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:10252–10256
59. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. Diabetes 1990; 39:933–937
60. Daniel D, Wegmann DR. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:956–960
61. Diabetes Control and Complications Trial, Epidemiology of diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1A diabetes four years after a trial of intensive therapy. N Engl J Med 2000; 342: 381-389
62. Vajo Z, Duckworth WC. Genetically engineered insulin analogs: diabetes and the new millennium. Pharmacol Rev 2000; 52:1-9
63. Bolli GB, Owens DR. Insulin glargine. Lancet 2000; 356: 443-445.
64. Meyer L, Guerci B. Metformin and insulin in type 1A diabetes: the first sep. Diabetes Care 2003; 26: 1655-1656
65. Shapiro AM, Lakey JR, Tyan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1A diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 2000; 343: 230-238
66. Bendelac A, Boitard C, Bach JF, Carnaud C. Neonatal induction of allogeneic tolerance prevents T cell-mediated autoimmunity in NOD mice. Eur J Immunol 1989; 19: 611-616
67. Ito A, Aoganagi N, Maki T. Regulation of autoimmune diabetes by interleukin 3-dependent bone marrow-derived cells in NOD mice. J Autoimmun 1997; 10: 331-338
68. Creusot RJ, Fathman CG. Gene therapy for type 1 diabetes: a novel approach for targeted treatment of autoimmunity. J Clin Invest 2004; 114: 892-894
69. Eisenbarth GS, Polonsky KS, Buse JB. Type 1 Diabetes Mellitus. En: Larsen: Williams Textbook of Endocrinology. 10^{th} ed. Elsevier. 2003. Páginas 1485-1508
70. Bao F, Yu L, Babu S, et al. One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease associated transglutaminase autoantibodies. J Autoimmun 1999; 13:143–148
71. Yu L, Brewer KW, Gates S, et al. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:328–335
72. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody–positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:4062–4067

26

ENFERMEDADES AUTOINMUNES TIROIDEAS

Juan B. Pinzón B.



Contenido

Generalidades
- Genética
- Factores ambientales
- Autoanticuerpos

Entidades clínicas
- Tiroiditis de Hashimoto y Tiroiditis atrófica
- Enfermedad de Graves-Basedow
- Tiroiditis silente (subaguda linfocitaria y posparto)
- Aborto y EAT

La enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto (Hipotiroidismo autoinmune) son las principales enfermedades autoinmunes tiroideas (EAT). Reflejan la pérdida de la tolerancia inmunológica. Ambas tienen en común la presencia de una respuesta autoinmune tanto celular como humoral dirigida contra antígenos de la glándula tiroidea. La alteración funcional ocurre cuando los autoanticuerpos y/o los linfocitos T sensibilizados se unen a la membrana de las células tiroideas causando reacción inflamatoria y, en algunos casos, lisis celular. Como otras enfermedades autoinmunes, se presentan por la interacción de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. Algunos de los genes son comunes para ambas entidades, indicando que existe una susceptibilidad genética compartida en los dos procesos. Otros genes son específicos para cada una de ellas. En este capítulo se revisan las EAT, sus mecanismos fisiopatológicos y presentación clínica.

Generalidades

Las Enfermedades autoinmunes tiroideas (EAT) que incluyen a la enfermedad de Graves (EG) y la tiroiditis de Hashimoto (Hipotiroidismo autoinmune) (TH) entre otras, son las condiciones autoinmunes más frecuentes, llegando a afectar al 2-5% de la población occidental (1). Reflejan previsiblemente la pérdida de la tolerancia inmunológica. Tienen en común la presencia de una respuesta inmune tanto celular como humoral dirigida contra antígenos de la glándula tiroidea, con infiltración de la tiroides en forma reactiva, tanto por células T como B, y la producción de autoanticuerpos, con las subsiguientes manifestaciones clínicas de éste proceso (2).

La presencia de estas células causa daño tisular y altera la función de la glándula tiroidea. El daño ocurre cuando los autoanticuerpos y/o los linfocitos T sensibilizados, se unen a la membrana de las células tiroideas causando reacción inflamatoria y, en algunos casos, lisis celular.

Como otras enfermedades autoinmunes, se presentan por la interacción de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. Algunos de los genes son únicos para la EG y TH, y otros son comunes para ambas enfermedades, indicando que existe una susceptibilidad genética compartida en los dos procesos. Los genes candidatos incluyen los inmunoreguladores (antígenos leucocitarios humanos –HLA-, antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos –CTLA4-) y otros específicos de la tiroides (receptor de TSH, Tiroglobulina, entre otros). Los factores ambientales más investigados incluyen el estrés, el tabaquismo y el consumo de yodo, entre otros.

Genética de las EAT

En modelos animales hay evidencia que defectos inmunes genéticamente determinados llevan a intolerancia hacia los antígenos propios (3). La constitución genética, incluyendo tanto genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) como otros no pertenecientes a éste complejo, determinan que tan propenso es un individuo al desarrollo de una enfermedad autoinmune (4).

Los factores genéticos juegan un papel clave en la patogénesis de las EAT, calculándose que hasta un 80% de la susceptibilidad para el desarrollo de la EG, por ejemplo, es atribuible a la presencia de genes determinados (5). La asociación de la antígenos de clase II del MHC con EAT se conoce hace más de 20 años, pero la variante etiológica primaria en ésta región es aún desconocida (1). Adicionalmente, un polimorfismo del gen CTLA-4, que es una molécula co-estimuladora e inmunoreguladora (regulador negativo) expresada sobre la superficie de los linfocitos T activados, ha sido identificado como un determinante primario para el desarrollo de EG (6) y de TH (7). Genes específicos de proteínas tiroideas, como la tiroglobulina, también están siendo investigados para definir su vinculación con el desarrollo de estas enfermedades (cer Capítulo 19). Adicionalmente, pueden mencionarse los genes que regulan citoquinas inflamatorias, las cuales pueden afectar el proceso de autoinmunidad a través de varios procesos: reclutamiento de células inflamatorias, regulación positiva de moléculas que perpetúan la respuesta inflamatoria (8) e interferencia de la síntesis hormonal (Figura 1).

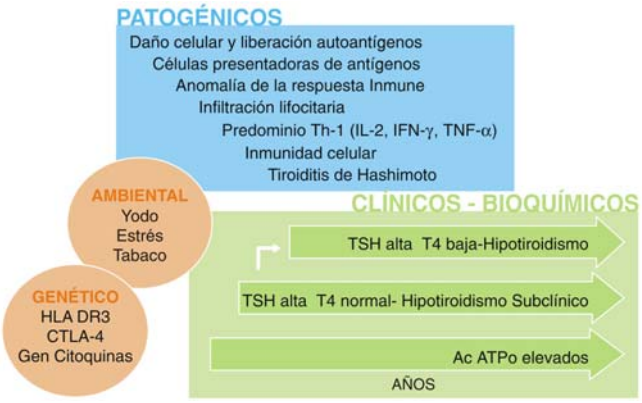


FIGURA 1.
Eventos patogénicos, bioquímicos y clínicos en EAT.
Tiroiditis de Hashimoto como ejemplo

Estudios en gemelos homocigotos han permitido apoyar la hipótesis que la agregación familiar de los autoanticuerpos tiroideos es determinada genéticamente y no responde a un ambiente compartido (9).

La EG esta asociada al HLA-DR3 que se presenta hasta en el 55% de pacientes con ésta enfermedad, comparado con una frecuencia máxima en la población general del 30% (2). En TH se ha observado que el HLA-DR3 y -DR5 son los más vinculados y generan mayor riesgo (2). De otra parte, algunos estudios han sugerido que algunos alelos del HLA-DQ podrían ser un marcador genético para resistencia al desarrollo de EAT (10). Actualmente se considera que tanto el HLA-DR3 como el CTLA-4 son los genes candidatos más vinculados al desarrollo de EAT.

Factores ambientales

Se ha invocado que el bajo peso al nacimiento, el exceso o déficit de yodo, la deficiencia de selenio, el uso de anovulatorios, paridad, microquimerismo fetal, estrés, las estaciones y cambios climáticos, el tabaquismo, fenómenos alérgicos y la radiación, así como procesos infecciosos virales o bacterianos pueden en mayor o menor medida estar involucrados en la aparición de EAT (11).

Se ha sugerido que los anticuerpos que se producen contra ciertos agentes infecciosos como la *Yersinia enterocolitica* pueden reaccionar contra proteínas presentes en algunas células humanas (por semejanzas estructurales), mediante el mecanismo de mimetismo molecular (12). Otros sin embargo, no consideran esta teoría como patogénica en el desarrollo de EAT (13).

Ha sido clara y consistente la relación entre el tabaquismo actual y el riesgo de desarrollar orbitopatía en pacientes con EG (14); como también se ha documentado la relación entre eventos que generan estrés y el comienzo de esta enfermedad (15).

El yodo es un importante elemento ambiental que inicia y promueve las EAT (4). En áreas con déficit en yodo,

la adición de ésta molécula a la sal ha generado la aparición de anticuerpos contra la tiroides. Además, la ingesta elevada de yodo acelera la tiroiditis autoinmune en modelos animales. Se ha postulado que la yodinación de la tiroglobulina aumenta su antigenicidad y que la generación de radicales libres promueve la destrucción de las células tiroideas.

Autoanticuerpos

La presencia de anticuerpos contra la peroxidasa (AcTPo) y la tiroglobulina (AcTGB) son frecuentes en pacientes con EAT. Sin embargo, éstos pueden observarse en individuos que no presentan manifestaciones clínicas ni bioquímicas de disfunción tiroidea así como estar ausentes en individuos en quienes se demuestra la presencia histológica de TH. Así mismo, es frecuente el hallazgo de anticuerpos contra el receptor de TSH (Ac RTSH) en pacientes con historia pasada o presente de EG (Tabla 1).

La presencia de títulos bajos de anticuerpos en ausencia de enfermedad se ha relacionado a un mayor riesgo para el desarrollo de EAT futura, particularmente tiroiditis posparto (TPP). Este es un hallazgo frecuente en mujeres con abortos habituales. También se ha vinculado su presencia a una mayor probabilidad de disfunción tiroidea asociada al uso de fármacos que tienen la potencialidad de interactuar a nivel tiroideo (carbonato de litio, amiodarona, interferón alfa). De manera similar, la presencia de estos anticuerpos ha sido observada en pacientes que presentan enfermedades autoinmunes diversas tales como diabetes tipo 1, síndrome de Sjögren, anemia perniciosa, y vitíligo, entre otras. El proceso de envejecimiento hace más común la presencia de estos anticuerpos. Su presencia, además, ha sido detectada hasta en un 50% de mujeres familiares en primer grado de individuos con EG y TH y hasta en un 30% de varones, lo cual ha permitido sugerir un patrón de herencia dominante (7). Los AcATPo que ocurren en forma "natural" no son uniformes en especificidad y tienden a ser dirigidos contra epítopes particulares.

Recientemente, se ha descrito la detección de anticuerpos contra las hormonas tiroideas tanto en EAT como en otras patologías diferentes. Específicamente y en algunas áreas geográficas, la prevalencia de tales anticuerpos asociados tanto a EG como a TH se puede aproximar al 20%, habiendo aumentado su presentación hasta 5 veces en las últimas dos décadas (16). El significado clínico de tales hallazgos no ha sido aclarado aún, pero lo que si es evidente es que la interpretación de los niveles hormonales puede variar en presencia de tales anticuerpos y que su creciente presencia, asociada a estas enfermedades, obliga a tenerlos en cuenta en el momento de seleccionar las mediciones hormonales más apropiadas para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

El reconocimiento de muchos de estos anticuerpos, si bien no genera en la actualidad una intervención directa contra ellos, si puede permitir intuir un desenlace clínico particular o una respuesta terapéutica específica en casos seleccionados. Se conoce, por ejemplo, que la completa ablación del tejido tiroideo, con cirugía y yodo, resulta en la desaparición de los anticuerpos contra todos los antígenos tiroideos mayores, afianzando el concepto que la producción continua de estos anticuerpos depende de la persistencia de los autoantígenos (17).

En la práctica clínica diaria se conoce que en pacientes con EG la tasa de recaídas después de suspender la terapia con medicamentos antitiroideos es elevada cuando los AcRTSH están presentes, y su ausencia genera así mismo una disminución del 65% en el riesgo de recurrencia (18). Sin embargo, las implicaciones prácticas de tales anticuerpos como predictores de recaídas se debaten actualmente, por lo tanto estos anticuerpos no se utilizan rutinariamente con éste fin. Otra eventual utilidad práctica de los anticuerpos ocurre en pacientes con EG, con o sin orbitopatía prominente. Cuando la complicación mencionada es el rasgo dominante de la enfermedad, se detectan con mayor frecuencia niveles elevados de AcRTSH del tipo de inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides (IET) y bajos niveles séricos de AcATPo. En contraste, los niveles séricos de inhibidores de la unión a tirotropina (IUT) (otra forma de medir los AcRTSH), son más elevados en ausencia de orbitopatía (19).

Entidades clínicas

Tiroiditis de Hashimoto y Tiroiditis atrófica

Se describe en conjunto por cuando su denominador común es el desarrollo de hipotiroidismo y por tanto sus manifestaciones clínicas y tratamiento son similares (Tabla 2).

Tabla 1. Autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes tiroideas.

Autoantígenos	Acciones	Evento clínico
Tiroperoxidasa	Aparecen involucrados en procesos destructivos titulares. Fijan el complemento.	Tiroiditis de Hashimoto Tiroiditis Atrófica Tiroiditis Posparto
Tiroglobulina	Áreas yodo suficientes útil para reproducibilidad de Tiroglobulina Áreas yodo deficientes útiles para definir EAT en pacientes con bocio nodular. No fijan el complemento.	No proceso específico Presente T. Hashimoto
Receptor TSH	Imitan o bloquean la acción de la TSH	Hipotiroidismo (T. Atrófica) Enfermedad de Graves
Transportador Yodo-Sodio	Descrito pero papel desconocido	No proceso específico

TABLA 2. Clasificación y expresión de las enfermedades autoinmunes tiroideas.

Entidad	Características clínicas
Autoinmunidad sin disfunción	¿Infertilidad? Abortos habituales
Tiroiditis de Hashimoto	Bocio difuso. Hipotiroidismo
Tiroiditis Indolora Esporádica/PosParto	Triple fase. Bocio mínimo blando Hipertiroidismo/Hipotiroidismo/Normal
Tiroiditis Atrófica	Ausencia tiromegalia. Hipotiroidismo
Enfermedad de Graves-Basedow	Hipertiroidismo

Etiología y epidemiología

Descrita desde 1912 como "struma linfomatosa", la TH resulta de la respuesta inmune generada por la infiltración anómala de células linfoides que responden a autoantígenos específicos y llevan a la destrucción de los folículos tiroideos. Los linfocitos son tanto del tipo T y B con predominancia del subtipo Th1 (ver Capítulo 7) (Figura 1). La edad promedio de aparición es 35 años, con una razón mujer a hombre de 24:1 (20).

En la tiroiditis atrófica (TA) se encuentra tejido fibroso que remplaza el parénquima tiroideo normal y se presenta, como se mencionó anteriormente, con clínica de hipotiroidismo manifiesto. Hasta el 50% de pacientes con esta variante tienen anticuerpos positivos. Desde el punto de vista patogénico la TA está más relacionada con la EG, dada la predominancia de los linfocitos Th2 y de AcRTSH, que se comportan como inhibidores y no como estimulantes tal como sucede en la EG.

Manifestaciones clínicas

Puede presentarse con los síntomas típicos del hipotiroidismo (Tabla 3) o ser sospechada por la presencia de bocio semiduro de lento crecimiento. Eventualmente, otra alteración clínica o bioquímica, puede generar las investigaciones que terminan con su diagnóstico (infertilidad, abortos habituales, trastornos del ciclo, hiperprolactinemia, hipercolesterolemia u otra enfermedad de base autoinmune -DM1, Addison, vitíligo, entre otras-). Queda por anotar que los síntomas del hipotiroidismo, tomados en su conjunto sindromático, tienen una gran sensibilidad diagnóstica pero su especificidad es baja. Por lo tanto, las pruebas bioquímicas se constituyen en patrón de oro para el diagnóstico de disfunción tiroidea (Tabla 3).

Hallazgos de laboratorio

Lo más común (49%) es diagnosticar estos pacientes cursando con niveles de TSH elevados y hormonas periféricas normales (hipotiroidismo subclínico –HSc-). Hasta en un 32% se diagnostican con hallazgos bioquímicos típicos de hipotiroidismo manifiesto (TSH elevado con T4 libre bajo). Lo menos frecuente es identificarlos en fase de eutiroidismo (19%) (20). Sin embargo, dada la practica de pruebas de tamizaje, se identifican cada día más pacientes en fase de disfunción mínima y menos en cuadros bioquímicos avanzados y típicos del hipotiroidismo clínico (HC). En nuestro medio la positividad de los AcTPo y AcTGB es respectivamente del 83 y 52%, teniendo como patrón de oro el estudio histológico (20). En población escolar, entre los 5-15 años, se ha reportado una prevalencia de AcTPo del 10% (21).

Tratamiento

Éste consiste en la administración de hormona tiroidea (Levotiroxina –LT4-) habitualmente por el resto de la vida. Es evidente la necesidad de esta administración a pacientes con HC, pero aún hoy existe mucha controversia sobre su uso indiscriminado en pacientes con HSc sin evidencia de autoinmunidad (22). Si el hallazgo de éste último no se acompaña de factores de riesgo para el desarrollo de HC (anticuerpos, niveles moderadamente altos de TSH) (23), o si la intervención no afecta otros factores de riesgo o patologías presentes (depresión, infertilidad, embarazo, hipercolesterolemia, ateroesclerosis), se podría aconsejar en algunos casos de insuficiencia tiroidea leve hacer seguimiento bioquímico sin tratamiento, con medición de TSH cada 6-12 meses (24-26). La suplencia de LT4 a dosis promedio de 1.7ugm/kg/día es la terapéutica habitual. Esta dosificación se puede administrar a dosis completa desde el diagnóstico en personas jóvenes, pero siempre se recomienda precaución y un inicio y aumento de dosis más lento en la tercera edad o en pacientes con patología cardiovascular. Definitivamente también se requieren dosis menores en individuos con HSc en quienes se decida administrar el medicamento. La coadministración de LT4 con T3, muy común en décadas pasadas, ha sido investigada y no proporciona ventajas que hagan aconsejable su utilización (27). La monoterapia con LT4 en dosis apropiadas genera niveles uniformes tanto de T4 como de T3 sin variaciones diurnas significativas y por tanto es la terapéutica de elección. Salvo en casos particulares, en los que se desea niveles de TSH suprimido (cáncer, terapia supresiva para bocio, etc.), un nivel entre 1-2 mUI/ml corresponde a una suplencia óptima en casos de hipotiroidismo primario (28).

Se sabe que hasta un 20% de pacientes con TH logran recuperar su función, pero la identificación de tales pacientes mientras se administra LT4 es compleja (29).

Enfermedad de Graves-Basedow

Etiología y epidemiología

Esta entidad explica hasta el 80% de casos de hipertiroidismo (Tabla 2). Ocurre más comúnmente en menores de 40 años y es diez veces mas frecuente en muje-

res que en hombres. Cursa con hiperplasia folicular, infiltración linfocitaria en parches y, ocasionalmente, formación de centros germinales linfoides. En este caso, y a diferencia de la TH, los linfocitos más comunes son del subtipo Th2. Los anticuerpos más comunes son aquellos que interaccionan con el receptor de la TSH, los cuales estimulan tanto el crecimiento como la función tiroidea. Los fenómenos de autoinmunidad se presentan hasta en el 95% de pacientes no tratados (30).

Manifestaciones clínicas

Además de las manifestaciones comunes a todas las formas de tirotoxicosis (Tabla 3), los tres criterios para su diagnóstico son la presencia de bocio, orbitopatía y dermopatía. La oftalmopatía infiltrativa clínicamente evidente se presenta en el 50% de pacientes, pero se detecta en casi todos si se utilizan diversos métodos diagnósticos. Su patogénesis y tratamiento no son el objeto del presente texto. La alteración cutánea, muy infrecuente por lo demás, va desde escasos parches de piel engrosada a nivel pretibial hasta elefantiasis que puede comprometer toda la pierna.

Hallazgos de laboratorio

Los signos y síntomas llevan a sospechar el diagnóstico y la etiología en la mayoría de casos. La medición de TSH y T4 libre clasifica adecuadamente a muchos enfermos (31). Una TSH suprimida con o sin aumento de las hormonas libres hace diagnóstico respectivamente de hipertiroidismo clínico o subclínico. Los estudios gamagráficos habitualmente no son necesarios, salvo cuando se planea realizar terapia con yodo o se sospecha otras causas de tirotoxicosis, tales como una tiroiditis (útil en clasificación etiológica clínicamente no discernible) (21).

Tratamiento

Está dirigido a la glándula tiroidea o a las manifestaciones generadas por el exceso de producción hormonal (restaurar eutiroidismo y controlar síntomas). Ninguna intervención dirigida al fenómeno autoinmune por sí mismo ha probado ser útil. Las tres modalidades terapéuticas utilizadas habitualmente son los medicamentos antitiroideos (AT), el yodo-131 (I-131) y la cirugía. La elección depende de las características clínicas del paciente, disponibilidad de recursos médicos, área geográfica de ejercicio médico y otras variables (Tabla 4). El tratamiento debe ser individualizado y para ello deben tenerse en cuenta factores como la severidad de la enfermedad, el estado clínico y edad del paciente, la presencia de oftalmopatía, posiblemente el tamaño del bocio y las preferencias personales del enfermo. En muchos casos se requiere un tratamiento primario y luego uno definitivo (Tabla 4).

Tiroiditis silente (subaguda linfocitaria y posparto)

Etiología y epidemiología

Como su nombre lo indica es un proceso silente (TS) y esporádico que, sin embargo, explica entre el 4-23% de casos de tirotoxicosis en Norteamérica. Histológicamente es

Tabla 3. Signos y síntomas de disfunción tiroidea.

Síntomas hipotiroidismo	%
Astenia	*31*
Aumento de peso	*25*
Intolerancia al frío	*22*
Estreñimiento	*18*
Piel seca	*17*
Pérdida de peso	*9*
Somnolencia	*7*
Caída de cabello	*5*
Edemas	*4*
Depresión	
Signos hipotiroidismo	**%**
Lentitud de movimientos	70-90
Piel y cabello ásperos	70-100
Fase relajación lenta-reflejos	50
Piel fría	10-90
Bocio	*52*
Disfagia	*8*
Hipertensión diastólica	

Síntomas hipertiroidismo	%
Nerviosismo e irritabilidad	60-99
Intolerancia al calor	41-89
Palpitaciones y taquicardia	63-89
Diaforesis	45-91
Temblor	40-97
Pérdida de peso	52-85
Alteración en el apetito	11-65
Hiperdefecación	12-33
Astenia, adinamia	44-88
Hiperactividad	39-80
Signos hipertiroidismo	
Bocio	
Orbitopatía	
Dermopatía	
Hiperactividad	
Hiperreflexia	
Taquicardia (fibrilación)	
Onicolisis	
Temblor fino distal	
Hipertensión sistólica	
Debilidad muscular proximal	

La letra cursiva menciona porcentajes en Hipotiroidismo por Hashimoto
Lo subrayado son hallazgos típicos de Enfermedad de Graves

TABLA 4. Opciones terapéuticas en enfermedad de Graves-Basedow.

Terapéutica	Características	Ventajas	Desventajas
Antitiroideos PTU 100-150mg tid Metimazol 5-15mg hasta 30mg bid.	Remisión Inmune Genero femenino Mayores 40 años Altos AcTPO Bocio pequeño Cuadro leve AcTSH negativos	Costo No deterioro orbitopatía Raro Hipotiroidismo ¿Abate proceso inmune?	Recurrencia elevada (42%) Brote cutáneo Agranulocitosis (raro) Tratamiento prolongado
Cirugía		Efecto Inmediato Baja recaída	Operador dependiente Hipoparatiroidismo Hipotiroidismo Lesión laringeo Infección herida Anestesia general
Yodo	Resistencia Mayores 40 años Genero femenino Cuadro severo Bocio mayor 40g ¿PTU previo?	Mínima invasividad Baja recaída (depende dosis) Seguro Fácil administración	Efecto mediato Sialadenitis Hipotiroidismo Empeora orbitopatía

otro tipo de tiroiditis linfocitaria que se observa con frecuencia en áreas deficitarias de yodo luego de la introducción de una dieta rica en el mismo. El 10% del total de casos de esta entidad corresponde a la variante posparto. Esta es la fase aguda de un tipo de destrucción autoinmune de la tiroides que genera un síndrome de disfunción glandular permanente o transitoria, que ocurre hasta un año después del parto, con una prevalencia entre el 1.1-21.1% (32). La reacción de rebote que sigue al estado de tolerancia inmune generada por el embarazo, y el microquimerismo fetal (33) explica en parte su desarrollo. Los genotipos HLA-DR3, DR4, y DR5 han sido asociados (Capítulo 18).

Manifestaciones clínicas

Se sospecha por la aparición de bocio y síntomas y signos que simulan hipertiroidismo. Los síntomas son habitualmente recientes y hay ausencia de compromiso ocular. El curso clínico habitualmente es bi o trifásico en el cual se observa inicialmente hipertiroidismo (en la TPP entre el primero y sexto mes del puerperio y con una duración de uno a dos meses) y luego una fase de hipotiroidismo (en la TPP entre el cuarto y octavo mes posparto y con una duración de cuatro a seis meses), para finalmente, en muchos pacientes, alcanzar un estado eutiroideo (34). El hipotiroidismo puede ser permanente en 12-61% de los pacientes (32). En la TPP, el hipotiroidismo se presenta más tempranamente cuando es precedido por el hipertiroidismo que cuando ocurre en forma aislada (hallazgos de laboratorio).

Niveles suprimidos de TSH junto con niveles normales (hipertiroidismo subclínico) o elevados (hipertiroidismo clínico) de T4 (libre idealmente) y T3 son habituales en la primera fase. Posteriormente varían de acuerdo a la evolución de las siguientes fases, pero en general es seguida casi invariablemente por la completa normalización de las pruebas tiroideas en pocos meses (Figura 2). A diferencia de la tiroiditis granulomatosa subaguda, la velocidad de eritrosedimentación es normal o sólo levemente acelerada. Los estudios de medicina nuclear (no obligatorios para el diagnóstico) muestran una captación reducida del radiofármaco a diferencia de la EG. La presencia de AcTGB y AcTPo se presenta durante la primera fase pero raramente persiste, y no se correlacionan con el desarrollo de hipotiroidismo permanente. Entre un 30 a 80% de pacientes con la enfermedad los presentan. Por otra parte, la presencia de AcTPo temprano durante el embarazo se asocia a una probabilidad de desarrollar TPP entre el 30-52% (factor de riesgo más no de pronóstico).

Tratamiento

Los casos leves habitualmente se observan sin terapia. En la fase de hipertiroidismo el uso de betabloqueadores puede ser beneficioso y, obviamente, los antitiroideos no tienen utilidad por cuanto no hay aumento de síntesis hormonal. En la segunda fase, si el paciente está sintomático, la administración de hormona tiroidea, transitoria o definitiva (de acuerdo al curso clínico), es necesaria durante al menos 2 a 4 meses, tiempo al cabo del cual algunos sugieren interrumpir y evaluar si ha ocurrido remisión. Otros

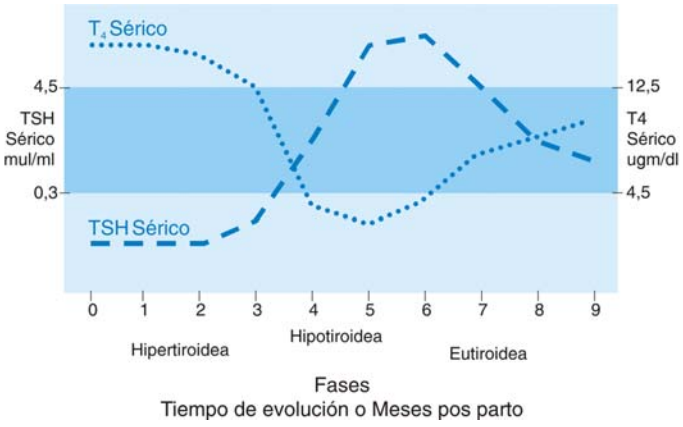


FIGURA 2. Esquema de eventos clínicos y bioquímicos tiroiditis silente (posparto y subaguda linfocitaria).

sugieren la administración permanente de LT4 hasta tanto termine la época reproductiva.

Aborto y enfermedad autoinmune tiroidea

La presencia de AcTPO y AcTGB aumenta en 2-4 veces la posibilidad de aborto. En mujeres abortadoras habituales hay un aumento de frecuencia de anticuerpos antitiroideos (35). El uso de LT4 en ausencia de disfunción, disminuyó la incidencia de abortos en un estudio no controlado (36). No es claro si estas pacientes pudieran tener un cuadro autoinmune subclínico y ser estos anticuerpos marcadores de tal estado, o bien encontrarse en una etapa preclínica de una enfermedad autoinmune tal como en el lupus eritematoso sistémico o es el síndrome antifosfolipídico. De hecho, es importante recalcar que las EAT pueden estar asociadas, de manera evidente o en forma subclínica, a otras enfermedades autoinmunes (37,38) (Tabla 5).

Tabla 5. Enfermedades asociadas a enfermedades autoinmunes tiroideas.

Enfermedad autoinmune		Cáncer	Otras
Órgano-Específicas	Sistémicas		
Enfermedad celíaca	LES	Seno	Sarcoidosis
Enfermedad de Addison	AR	Leucemia	Infección
Vitiligo	AR Juvenil	Gástrico	*H pylori*
Diabetes mellitus 1A	Esclerodermia		HVC
Anemia perniciosa	S. de Sjögren		
Alopecia areata	Vasculitis		
Esclerosis múltiple			
Miastenia gravis			
Cirrosis biliar primaria			
Hepatitis autoinmune			
Síndrome de Goodpasture			

LES: lupus eritematoso sistémico, AR: artritis reumatoide, HVC: Virus de la hepatitis C (adaptado de 38)

Referencias

1. Simmonds MJ, Gough SC. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disese HLA, CTLA-4 and beyond. Clin Exp Immunol 2004;136:1-10
2. Tomer Y, Davies T. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. Endocrine Reviews 2003;24:694-717
3. Ruwhof C, Drexhage H. Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. Thyroid 2001;11:427-36
4. Fountoulakis S, Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. Clin Endocrinol 2004;60:397-409
5. Brix T, Kyvik K, Christensen K, Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves´disease : a population based study of two Danish twin cohorts. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:930-4
6. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot L. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves´ disease in a caucasian population. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:41-5
7. Vaidya B, Kendall-Taylor P, Pearce S. The genetics of autoimmune thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:5385-97
8. Ajjan R, Weetman A. Cytokines in thyroid autoimmunity. Autoimmunity 2003;36:351-9
9. Brix TH, Hansen P, Kyvik K, Hegedüs L. Aggregation of thyroid autoantibodies in first-degree relatives of patients with autoinmune thyroid disease is mainly due to genes: a twin study. Clin Endocrinol 2004; 60:329-34
10. Tamai H, Kimura A, Dong R, et al. Resistance to autoimmune thyroid disease is associated with HLA-DQ. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:94-7
11. Prummer MF, Strieder T, Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. Eur J Endocrinol 2004; 150:605-18
12. Baker J. Autoimmune endocrine disease. JAMA 1997;278:1931-7
13. Tomer Y, Davies T. Infection, thyroid disease and autoimmunity. Endocrine Reviews. 1993;14:107-20
14. Bartalena L, Marcocci C, Pinchera A. Graves´ophthalmopathy: a preventable disease? Eur J Endocrinol 2002;146:457-61
15. Matos-Santos A, Nobre E, Costa J, et al. Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves´ disease and toxic nodular goiter. Clin Endocrinol 2001;55:15-9
16. Benvenga S, Trimarchi F. Increasing frequency and clinical significance of thyroid hormone autoantibodies. Curr Opin Endocrinol Diabetes 2004;11:209-13
17. Chlovato L, Latrofa F, Braverman L, et al. Dissapearance of humoral thyroid autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. Ann Intern Med 2003;139:346-51
18. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H, Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves´ Disese. J Clin Endocrinol Metab 1994;78:98-102
19. Goh S, Ho S, Seah L, Fong K, Khoo D. Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves´disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. Clin Endocrinol 2004;60:600-7
20. Escobar I, Kattah W, Niño A, Acosta E, Saavedra C, Ucrós A. Tiroiditis de Hashimoto. Estudio de 100 casos. Acta Med Colomb 1991;16:18-29
21. Asociación Colombiana de Endocrinología. Consenso Colombiano para el diagnóstico y manejo de las enfermedades tiroideas. Acta Med Colomb 1998;24:159-74
22. Huber G, Staub J, Meier C, et al. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 3221-6
23. Tunbridge W, Brewis M, French J, et al. Natural history of autoimmune thyroiditis. BMJ 1981;282:258-62
24. Vanderpump M, Tunbridge M. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. Thyroid 2002;12:839-47

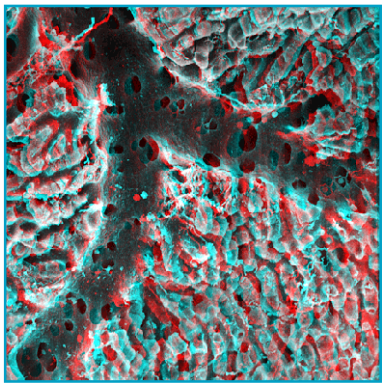
25. Helfand M. Screening for subclinical thyroid dysfunction in nonpregnant adults: A summary of the evidence for the U.S. preventive services task force. Ann Intern Med 2004;140:128-41
26. Pinzón J. Hipotiroidismo: Aspectos epidemiológicos. Medicas UIS 2000;14:157-62
27. Clyde P, Harari A, Getka E, Mohamed K. Combined levothyroxine plus liothyronine compared with levothyroxine alone in primary hypothyroidism. JAMA 2003;290:2952-8
28. Clarke N, Kabadi U. Optimizing treatment of hypothyroidism. Treat Endocrinol 2004;3:217-21
29. Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Test for recovery from hypothyroidism during thyroxine therapy in Hashimoto´s tyiroiditis. Lancet 1990;336:1084-6
30. Lazarus J. Hyperthyroidism. Lancet 1997;349:339-43
31. Weetman A. Graves´ Disease. N Eng J Med 2000;343:1236-48
32. Muller A, Drexhage H, Berghout A. Postpartum thyroiditis and autoimmune thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. Endocrine Rev 2001; 22:605-30
33. Ando T, Davies T. Postpartum autoimmune thyroid disease: the potential role of fetal microchimerism. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:2965-71
34. Roti E, Uberti E. Post-partum thyroiditis -a clinical update. Eur J Endocrinol 2002;146:275-9
35. Stagnaro-Green A, Glinoer D. Thyroid autoimmunity and the risk of miscarriage. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2004;18:167-81
36. Vaquero E, Lazzarin N, De Carolis C, Valensise H, Moretti C, Ramanini C. Mild thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach. Am J Reprod Immunol 2000; 43:204-8
37. Gaches F, Delaire L, Nadalon S, Loustaud-Ratti V, Vidal E. Frequency of autoimmune diseases in 218 patients with autoimmune thyroid Pathologies. Rev Med Interne 1998;19:173-9.
38. Jenkins RC, Weetman AP. Disease associations with autoimmune thyroid disease. Thyroid 2002;12:977-88

27

ENFERMEDADES AUTOINMUNES HEPÁTICAS Y DIGESTIVAS

A. HEPATITIS AUTOINMUNE

Alejandra Cherñavsky



El hígado está continuamente expuesto a una gran carga antigénica, que incluye patógenos, toxinas, células tumorales y antígenos de la dieta. La pérdida de la tolerancia contra antígenos propios puede resultar en el desarrollo de la hepatitis autoinmune. Actualmente, se plantea que el proceso autoinmune es desencadenado por factores desconocidos (infecciones, agentes químicos, fármacos), en un huésped genéticamente susceptible. El proceso está caracterizado por una hiperreactivad de los linfocitos T dirigidos contra antígenos propios del hígado, y por la presencia de autoanticuerpos. Se divide en dos tipos principales, de acuerdo con el perfil de autoanticuerpos presentes. En general, la respuesta al tratamiento inmunosupresor con esteroides y azatioprina es buena.

Contenido

El hígado como órgano inmune
Definición de hepatitis autoinmune
Características de la hepatitis autoinmune tipo I
Tratamiento

El hígado como órgano inmune

Debido a su localización y su función, el hígado está expuesto continuamente a una gran carga antigénica que incluye patógenos, toxinas, células tumorales y antígenos menos "peligrosos" como los que ingresan con la ingesta de alimentos. La sangre fluye a través de los sinusoides hepáticos, los cuales al estar recubiertos por un endotelio que carece de membrana basal y presenta "perforaciones", hace posible la transmigración celular hacia el parénquima hepático. Los LT recirculan a través de la sangre y la linfa, y sólo entran a los órganos periféricos no linfoides luego de haber adquirido características de células activadas y diferenciadas. Cuando la activación de los LT ocurre en los órganos linfáticos secundarios, el proceso de activación y diferenciación requiere de 48 horas. El hígado constituye una excepción a este comportamiento general, debido a su capacidad de retener LT maduros vírgenes, principalmente LTCD8+, los que al cabo de 24 horas retornan a la circulación periférica convertidos en células activadas (1). El intercambio de células dendríticas precursoras entre la sangre sinusoidal y la linfa promueve una eficiente captura de antígenos. No sólo las células dendríticas actúan como presentadoras de antígeno (CPA), los LTCD8$^+$ pueden interactuar en forma directa con hepatocitos residentes, con células de Kupffer o del endotelio sinusoidal a través de prolongaciones citoplasmáticas con el fin de reconocer antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la membrana de dichos tipos celulares. En condiciones no patológicas, la presentación local de antígenos en el hígado conduce a la inactivación de los LT, tolerancia y apoptosis inducida por activación. El balance final de los múltiples mecanismos inmunológicos que se disparan en el hígado es una respuesta de tolerancia, que explica tanto la mayor sobrevida de los trasplantes hepáticos (en comparación a otros tipos de trasplantes) como la persistencia en forma crónica de agentes hepatotrópicos virales (2). Existen evidencias que la inducción de tolerancia "in vitro" es en parte debida a los bajos niveles de coestimulación que expresan los hepatocitos (3). A su vez, experimentos "in vivo" de expresión de antígenos en el hígado de animales transgénicos para el TCR específico -correspondiente a dicho antígeno- conduce a la inducción local de tolerancia.

Otra de las características que hacen del hígado un órgano inmunológico especializado es el tipo particular de linfocitos residentes que están presentes en el parénquima hepático (4). El 50% de los linfocitos intrahepáticos (LIH) son células no convencionales que expresan simultáneamente proteínas de membrana características de LT como de células NK (CD56, CD161 y/o KIRs, receptores que inhiben la respuesta citotóxica) denominadas NKT o "Natural T". Los LIH humanos comprenden 20% de células NK, 25% de LT y 5% de LB. Las células NKT incluyen subpoblaciones de células CD4+, CD8+ o doble negativas para dichos marcadores de LT. Respecto del tipo de receptor antigénico, pueden expresar TCR αβ o TCRγδ. Los LT no convencionales predominantes en el hígado son las células NKT clásicas o Vα24^{inv} T, denominación que se debe a la expresión de una cadena a invariante que les confiere capacidad de reconocimiento antigénico fuera del contexto clásico del MHC. Estas células también

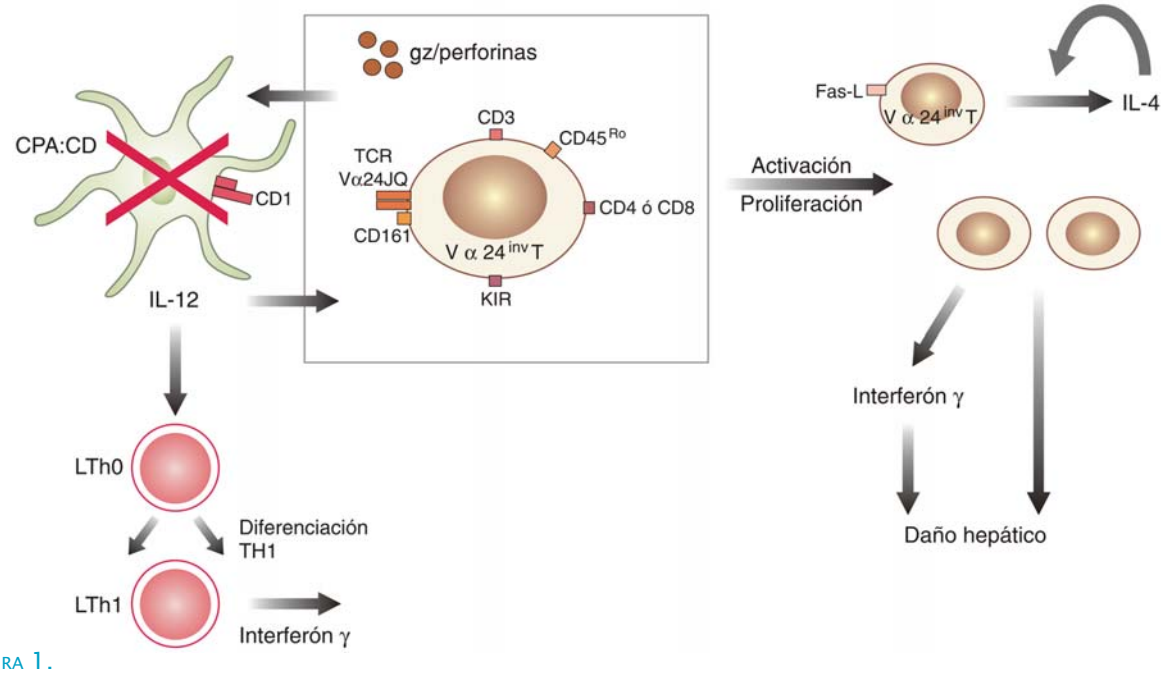


FIGURA 1.
Las células presentadoras de antígeno (CPA) dendríticas mieloides (CD) presentan el antígeno a las células NKT en contexto de CD1 a través del TCR Vα24. Durante la presentación antigénica las CPA-CD liberan IL-12 que ejerce dos efectos: 1- promueve citotoxicidad de las NKT y en consecuencia regula el número de CD (regulación negativa) y 2- promueve la expresión de Fas ligando (Fas-L) en la superficie de las células NKT. Éstas adquieren potencial citotóxico sobre hepatocitos vía Fas/ Fas-L y vía granzimas/perforinas. La IL-12 es, a su vez, la principal citoquina estimuladora de la diferenciación de LT helper1.

expresan $CD45^{Ro}$ característica de células maduras crónicamente activadas, y la molécula coestimulatoria CD161 (NKR-P1A) que actúa en la vía de presentación antigénica en el contexto de CD1 (una molécula semejante a las moléculas del MHC clase I pero no polimórfica) (5). Las células NKT poseen capacidad regulatoria tanto del balance de citoquinas Th1/Th2 como de la diferenciación de LT helper 1 intrahepáticas. La interacción entre CDs y NKT constituye, así mismo, un mecanismo regulatorio del balance Th1/Th2 debido a que las células NKT pueden ejercer citotoxicidad sobre dichas CPA. Además, las NKT activadas son fuente de IFN-γ y de IL-4, dos citoquinas que poseen capacidad citotóxica sobre los hepatocitos (Figura 1).

Resulta interesante la información que ofrece el modelo experimental murino de autoinmunidad hepática tipo I inducida por Concanavalina A. En este modelo, las células NKT son necesarias y suficientes para el desarrollo de la patología, y la producción de IL-4 por parte de estas células cumple un papel importante ya que aumenta la actividad citotóxica en forma autocrina, mediante la inducción de la expresión de granzima B y FasL (6).

Definición de hepatitis autoinmune

La hepatitis autoinmune (HAI) es la inflamación crónica y progresiva del hígado de causa desconocida. Basados en la especificidad de los autoanticuerpos se definen los diferentes tipos de HAI. En la Tabla 1 se presenta esta división. Debido a que es la entidad más caracterizada y común se hace referencia en el texto, en especial, a la HAI tipo I.

Características de la HAI tipo I (HAI-I)

Es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por hipergamaglobulinemia policlonal, presencia de autoanticuerpos y una respuesta necroinflamatoria hepática progresiva que con frecuencia evoluciona hacia la cirrosis y la falla hepática. Su incidencia media anual es de 1,9 por 100.000 habitantes. Presenta predominio en las mujeres (70%-90%), en una relación 3,6:1 con respecto a los hombres (8), y responde favorablemente al tratamiento con agentes inmunosupresores con esteroides y azatioprina (9,10).

Tabla 1. Clasificación de la hepatitis autoinmune de acuerdo al patrón de autoanticuerpos detectados.

Tipo de hepatitis autoinmune	Autoanticuerpos
Tipo I	ANA, SMA, p-ANCA, anti-ASGP-R, antiSLA/LP
Tipo II	Anti-LKM-1, anti-LKM-3, anti-LCI.

ANA: Anticuerpos antinucleares; SMA: anticuerpos antimúsculo liso; p-ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo perinuclear; anti-ASGP-R: anticuerpos contra el receptor de asialoglicoproteína; antiSLA/LP: anticuerpos contra antígenos solubles del hígado/antígeno del hígado y páncreas; anti-LKM: anticuerpos contra microsomas del riñón y el hígado; anti-LCI: anticuerpos contra la proteína citosólica del hígado tipo I (7).

La HAI se define como una hepatitis crónica activa, de moderada a severa actividad, que carece de lesiones biliares granulomatosas, siderosis o depósitos de cobre (11).

Alteraciones serológicas

La HAI-I se caracteriza por la presencia de anticuerpos anti- filamentos de actina del músculo liso (SMA) y/o anticuerpos antinucleares (ANA), los cuales pueden estar asociados con la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) patrón perinuclear (p-ANCA). Si bien colaboran en el diagnóstico de la enfermedad, no hay evidencias del papel inmunopatogénico de estos autoanticuerpos en las lesiones hepáticas (12). En consecuencia, el perfil de estos anticuerpos no se correlaciona con el grado de actividad necroinflamatoria aunque sus títulos disminuyen en respuesta al tratamiento con corticoides (10). Los niveles séricos de transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa) al igual que la bilirrubina reflejan la severidad del proceso inflamatorio hepático y descienden rápido como respuesta al tratamiento con esteroides. Los niveles de bilirrubina y fosfatasas alcalinas se encuentran levemente elevados en un 80 % de los pacientes, y valores bajos de albúmina se presentan en un 75% de los mismos (11).

Alteraciones histológicas

La evaluación histológica en la hepatitis crónica, incluyendo la HAI-I, comprende el análisis de la actividad necroinflamatoria (grado de actividad) y de la fibrosis, la distorsión de la arquitectura del parénquima hepático y la cirrosis (estadificación) según criterios histológicos adoptados utilizando el índice de actividad histológica de Knodell (13,14). Los hallazgos histológicos más frecuentes son la hepatitis de interfase con presencia de abundante infiltrado inflamatorio de predominio linfocitario, con o sin compromiso lobular (intraacinar) y puentes necróticos portoportales o portocentrales, con formación de rosetas y regeneración nodular.

Presentación y diagnóstico

En individuos con cuadros de hepatitis no resueltos es común la presencia de síntomas similares a los de la hepatitis viral aguda, con una combinación de síntomas: ictericia, acolia, coluria, hepatomegalia, esplenomegalia, arañas vasculares y acné, malestar general y fatiga, evidencias de cirrosis o con falla hepática fulminante. Un 50% de los pacientes no tratados fallece durante los primeros cinco años de la enfermedad siendo la remisión espontánea poco frecuente. El diagnóstico es complejo ya que ningún elemento (clínico, de laboratorio o histológico) es, por sí mismo, definitivo. Los criterios para el diagnóstico de esta enfermedad han sido establecidos por el Grupo Internacional de Estudio de la Hepatitis Autoinmune (15). Para este diagnóstico se requiere la presencia de determinadas características y la exclusión de otras condiciones que se asemejan. En la Tabla 2 se muestran los criterios diagnósticos definitivos y probables de la HAI.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de HAI.

Requisitos	Criterios diagnósticos Definitivo	Probable
Ausencia de enfermedad hepática genética	Fenotipo normal de alfa-1 antitripsina. Niveles séricos normales de ceruloplasmina, hierro y ferritina.	Deficiencia parcial de alfa-1 antitripsina. Anormalidades séricas no específicas de cobre, ceruloplasmina, hierro, y/o ferritina.
Ausencia de infección viral activa	Ausencia de marcadores de infección activa para virus de hepatitis A, B, y C.	Ausencia de marcadores de infección activa para virus de hepatitis A, B, y C.
Ausencia de lesión tóxica o por alcohol	Consumo de alcohol diario <25 g/d y no uso reciente de drogas hepatotóxicas.	Consumo de alcohol diario <50 g/d y no uso reciente de drogas hepatotóxicas.
Características de laboratorio	Predominio de elevación de transaminasas séricas. Nivel de globulinas, gamma-globulinas o inmunoglobulinas G > o = 1,5 veces del nivel normal.	Predominio de elevación de transaminasas séricas. Hipergammaglobulinemia en cualquier grado.
Autoanticuerpos	ANA, SMA, o anti-LKM1 > o = 1:80 en adultos, y > o = 1:20 en niños; no AMA.	ANA, SMA, o anti-LKM1 > o = 1:40 en adultos u otros autoanticuerpos.*
Hallazgos histológicos	Hepatitis de interfase. No lesiones biliares, granulomas, o cambios prominentes sugestivos de otra enfermedad.	Hepatitis de interfase. No lesiones biliares, granulomas, o cambios prominentes sugestivos de otra enfermedad.

* Incluye anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo perinuclear (p-ANCA) y anticuerpos generalmente no disponibles como antígeno hepático soluble/hepático pancreático (anti-SLA/LP), actina, citosol hepático tipo 1 (anti-LC1), y receptor asialoglicoproteína (anti-ASGPR).
Abreviaturas: ANA, anticuerpos antinucleares; SMA, anticuerpos antimúsculo liso; anti-LKM1, anticuerpos microsomal anti-hígado/riñón tipo 1; AMA, anticuerpos antimitocondriales.

Con base en la evidencia, las recomendaciones actuales referentes al diagnóstico de la HAI son las siguientes:

1. El diagnóstico de la HAI requiere de la determinación de niveles de aminotransferasas séricas y de gammaglobulinas; detección de ANA y/o SMA, o en su ausencia, anti-LKM1, y examen histológico de biopsia hepática.
2. Los criterios diagnósticos de HAI deben ser aplicados a todos los pacientes.
3. Si el diagnóstico de HAI no está claro, se debe utilizar el método de puntuación o score.

Si bien la HAI-I tiene características histológicas y serológicas comunes en los niños o en los adultos, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que el cuadro clínico y la susceptibilidad genética son diferentes en HAI-I pediátrica o en adultos (Tabla 3).

Inmunopatogénesis de la HAI-I

El establecimiento de esta patología puede ser considerado como una consecuencia de la pérdida de tolerancia inmunológica que gobierna el microambiente local del hígado. Si bien no se ha identificado el autoantígeno, se han propuesto a la familia de receptores de asialoglicoproteínas, así como a ciertos medicamentos, compuestos xenobióticos, bacterias o virus como agentes desencadenantes. Particularmente, infecciones por virus de la hepatitis A, B, C (HAV, HBV, HCV) y sarampión preceden en algunos casos el desarrollo de esta enfermedad. En

Tabla 3. Características diferenciales entre la HAI pediátrica y la HAI en adultos.

Característica diferencial (16-18)	HAI-I pediátrica	HAI-I en adultos
Porcentaje de pacientes con un modo de presentación similar al de un cuadro de hepatitis viral aguda.	70%	54%
Evolución a falla hepática fulminante.	Ocasional	No se observa
Porcentaje de pacientes que presentan remisión completa ante la administración de agentes inmunosupresores.	68%	90%
Porcentaje de pacientes que muestran manifestaciones autoinmunes extrahepáticas.	13%	48% Artritis, enfermedad tiroidea con autoanticuerpos, anemia hemolítica, enfermedad celíaca.
Hipergamaglobulinemia.	Marcada	Menos marcada
Porcentaje de pacientes con autoanticuerpos antifactor nuclear.	55%	73%
Porcentaje de pacientes con autoanticuerpos antimúsculo liso.	95%	74%
Asociación al sistema HLA en la población de pacientes argentinos de origen caucásico.	HLA II DRB1*1301, presente en un 66,6% de los pacientes pediátricos.	Asociación primaria a HLA I A11 presente en un 31% de los pacientes adultos. Asociación secundaria a HLA II DR4 en un 44% de los pacientes.

Sistema de puntuación para realizar el diagnóstico de hepatitis autoinmunes atípicas en adultos.

Categoría	Factor	Score
Sexo	Femenino	+2
Relación FAL/GOT (o GPT)	>3	-2
	<1,5	+2
Gammaglobulina o IgG (veces sobre el límite superior normal)	>2,0	+3
	1,5-2,0	+2
	1,0-1,5	+1
	<1,0	0
Títulos de ANA, SMA, o anti-LKM1	>1:80	+3
	1:80	+2
	1:40	+1
	<1:40	0
AMA	Positivo	-4
Marcadores virales de infección activa	Positivo	+3
	Negativo	-3
Drogas hepatotóxicas	Sí	-4
	No	+1
Alcohol	<25 g/d	+2
	>60 g/d	-2
Enfermedad autoinmune concurrente	Cualquier enfermedad no-hepática de origen inmune	+2
Otros autoanticuerpos	Anti-SLA/LP, actina, LC1, pANCA	+2
Características histológicas	Hepatitis de interfase	+3
	Células plasmáticas	+1
	Rosetas	+1
	Ninguna de las anteriores	-5
	Cambios biliares	-3
	Características atípicas	-3
HLA	DR3 o DR4	+1
Respuesta al tratamiento	Remisión completa	+2
	Remisión con recaída	+3
Score pretratamiento		
Diagnóstico definitivo		>15
Diagnóstico probable		10-15
Score postratamiento		
Diagnóstico definitivo		>17
Diagnóstico probable		12-17

Argentina existe una alta prevalencia de hepatitis A, y como se presenta en la Tabla 3, los niños con HAI-I exhiben un fuerte ligamiento al alelo HLA II DRB1*1301. Estudios recientes demostraron que dicho alelo se asocia también con las formas crónicas de HAV (no así en HAV que se autoresuelve) en pacientes argentinos. En estos pacientes si bien se observan características serológicas comunes a la HAI-I durante el primer año del curso de la hepatitis viral, quizás relacionadas con la continua liberación del autoantígeno responsable de la HAI-I, no se correlaciona su HAV crónica, con la presencia de HLA II DRB1*1301 ni con el advenimiento de HAI-I. Lo anterior sugirió claramente que la HAI-I en los niños requiere de la expresión de otros genes aún desconocidos, consistentemente con el concepto del origen multigénico de las patologías autoinmunes (19). El tratamiento con IFN-α en hepatitis crónicas B o C promueve la aparición de autoanticuerpos séricos y en algunos pacientes existen evidencias del comienzo de la patogenia autoinmune. Como mecanismos probables se sugiere la formación de neoantígenos, mimetismo molecular o inducción de citoquinas proinflamatorias como modificadores del microambiente tolerogénico presente normalmente en este órgano. No se conoce la contribución relativa de los componentes innato y específico en esta respuesta autoinmune. Además, las manifestaciones clínicas y la evolución de la HAI y la hepatitis producida por el HCV pueden ser similares en muchos pacientes, encontrándose como única diferencia la positividad de la infección en el segundo tipo de pacientes. Los anticuerpos antimicrosomales del hígado y riñón (LKM) se pueden presentar en un 10% de los pacientes infectados crónicamente con HCV. El mimetismo molecular entre el huésped y el virus puede ser el mecanismo a través del cual los anticuerpos anti-LKM se producen tanto en la infección por HCV y HAI tipo II (20).

Nuestro estudio de la HAI-I en pacientes pediátricos reveló la presencia de altos niveles de expresión de transcriptos de IFN-γ, IL-12p40 (polipéptido de 40 KDa), IL-12Rb2 (subunidad b2 del receptor de IL-12), IL-18, TGF-β1, IL-4 y Vα24 en biopsias hepáticas. El aumento en la expresión de estas moléculas, algunas de ellas indetectables en el hígado control, nos permite inferir su participación en los mecanismos responsables de la injuria hepática en los pacientes pediátricos. La IL-2 es capaz de inducir niveles basales de expresión de IL-12R en LT vírgenes. Sin embargo, el aumento en la expresión de este receptor requiere la presencia de IL-12 liberada por las diversas CPA. A su vez, la producción de IFN-γ inducida por IL-12 es responsable del mantenimiento de altos niveles de expresión de IL-12Rβ2 (21,22), molécula que controla la diferenciación del linaje Th1 (23). Uno de los efectos de IL-12 consiste en aumentar la expresión del receptor de IL-18 en las células productoras de IFN-γ, observándose un sinergismo entre IL-12 e IL-18 sobre la inducción de IFN-γ (24). La elevada expresión de IFN-γ, IL-12p40 y IL-12Rβ2 detectada en biopsias hepáticas de pacientes con HAI-I, es compatible con la participación de una respuesta de tipo 1. Debe destacarse, asimismo, que la presencia simultánea de altos niveles de expresión de IL-4 en las biopsias hepáticas no impide la sobreexpresión de moléculas asociadas a la respuesta tipo 1. Si bien en la literatura se otorga un papel central a las citoquinas Th1 en tejido hepático proveniente de pacientes adultos (25,26), la sobreexpresión de IL-4 en HAI-I pediátrica sugiere claramente la presencia de mecanismos inmunopatogénicos más complejos. En la Figura 2 se ilustra la interacción entre la susceptibilidad genética determinada por el MHC, un péptido antigénico y la producción de diferentes citoquinas favorecedoras del daño autoinmune en estos pacientes (27). Con respecto a los tipos celulares involucrados, hemos demostrado mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia de células $V\alpha24^{+}$ en los infiltrados de células mononucleares. Estas evidencias, junto con el incremento en los niveles de expresión de transcriptos de la cadena Va24 en biopsias hepáticas, sugieren la participación de

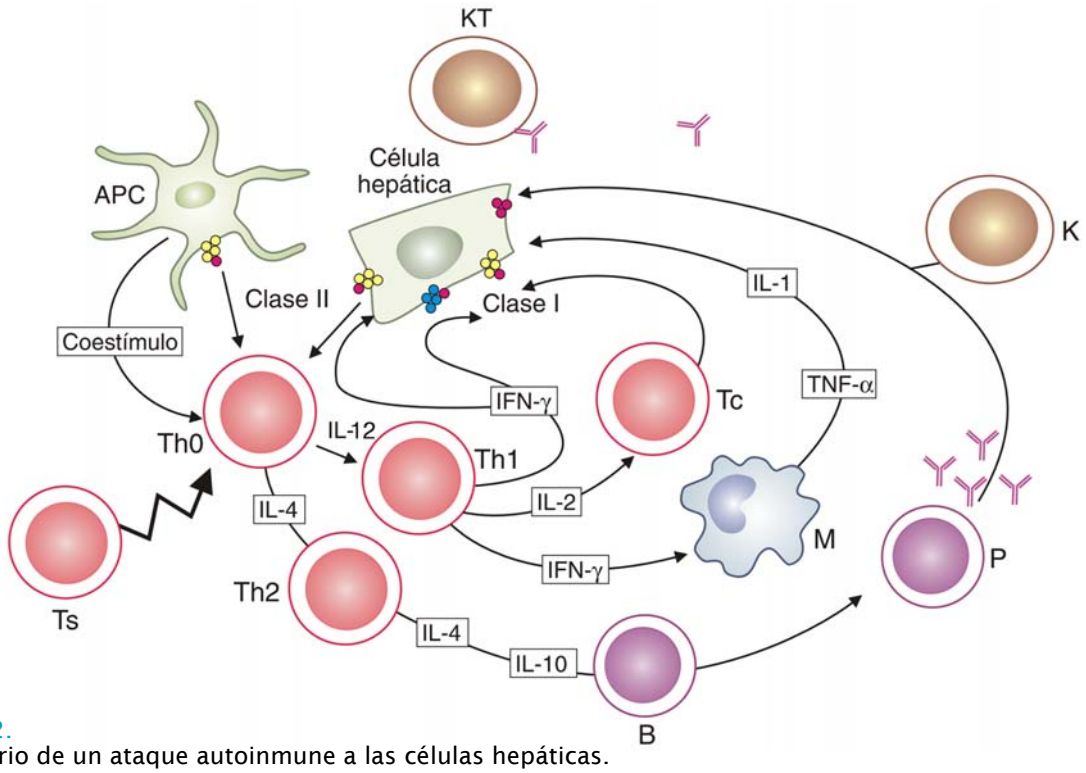


FIGURA 2.
Escenario de un ataque autoinmune a las células hepáticas.
Un péptido autoantigénico específico es presentado a una célula T ayudadora (Th0) en el contexto de una molécula de HLA clase II por la célula presentadora de antígenos (APC). Las células Th0 se activan y de acuerdo a la presencia en el medio de interleuquina (IL) 12 o IL-4 y a la naturaleza del antígeno, se diferencian en células con patrón Th1 y Th2 e inician una serie de reacciones inmunes determinadas por las citoquinas que ellas producen: las células Th2 secretan principalmente IL-4 e IL-10 y estimulan la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B; las células Th1 secretan IL-2 e IFN gama, las cuales estimulan a los linfocitos T citotóxicos (Tc), aumentando la expresión de moléculas de clase I e induciendo la expresión de moléculas HLA clase II en los hepatocitos y activando los macrófagos; los macrófagos activados liberan IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Si los linfocitos T supresores (Ts) no se oponen a este proceso, una variedad de mecanismos efectores se desencadenan: la destrucción de las células hepáticas se podría derivar de la acción de los linfocitos Tc; citoquinas liberadas por las células Th1 y macrófagos reclutados; activación del complemento o acción de los linfocitos asesinos (K) por la unión de los autoanticuerpos unidos a la superficie de los hepatocitos.

células NKT clásicas ($V\alpha24^{+\ inv}$ T) (28). Hemos investigado la participación de IL-15 en HAI-I pediátrica, citoquina de respuesta innata involucrada en el mantenimiento de las poblaciones NK/NKT. Si bien sus niveles estacionarios de transcriptos no difieren respecto de los niveles de expresión en el hígado control, deben aún investigarse las funciones biológicas de la proteína IL-15 en la patología dado que la misma está sujeta a una regulación transcripcional y postranscripcional (29).

Por último, otro hallazgo interesante es la presencia de infiltrados oligoclonales de $LTCD8^{+}$ en el hígado de pacientes adultos, resultados obtenidos por técnicas de RT-PCR y Southern blot de la región CDR3 de la cadena γ del TCR (30). Nuestros resultados recientes confirmaron su presencia en pacientes pediátricos con HAI-I, no observándose este tipo de expansiones clonales en el tejido hepático control. La presencia local de linfocitos $CD45^{RO}$ de linaje T y/o NKT sugiere que el mantenimiento de esta patología requiere de células de memoria, de fenotipo posiblemente efector (subpoblación $CCR7^{-}$).

Tratamiento

La HAI responde adecuadamente al manejo inmunosupresor a menos que el paciente presente clínicamente falla hepática aguda, situación en la cual es necesario un trasplante hepático urgente . El tratamiento estándar consiste en la administración de prednisolona con o sin azatioprina, con el cual se logra una remisión (pruebas hepáticas normales) en más de un 90% de los pacientes (31). En un 20% de los pacientes con HAI tipo I que alcanzan una remisión el tratamiento se puede detener por completo de forma exitosa en unos pocos años; mientras que en los pacientes con HAI tipo II, el tratamiento por lo general debe continuarse de por vida. Una remisión sostenida de la HAI se ha reportado en pacientes adultos en tratamientos prolongados con azatioprina como único fármaco (32). Otros fármacos efectivos en el manejo de la enfermedad son la ciclosporina A y el micofenolato mofetilo (33,34).

Conclusión

Debido a su alta incidencia en amplias zonas geográficas estudiadas así como al porcentaje de trasplantes hepáticos que reconocen su origen en la hepatitis autoinmune, promover y ahondar su estudio adquiere especial relevancia. Las evidencias experimentales aquí mencionadas permiten concluir que la injuria hepática en HAI-I pediátrica sería consecuencia no sólo de una respuesta de tipo 1,

sino de la desregulación de la función de células NKT hepáticas. Resta aún profundizar las causas que a nivel molecular determinan el desarrollo de las diferentes formas de presentación de esta enfermedad en niños y adultos. El conocimiento del autoantígeno que la desencadena es de primordial importancia ya que ampliaría, sin lugar a dudas, las fronteras para el desarrollo de métodos de pronóstico, diagnóstico y de tratamiento de esta patología.

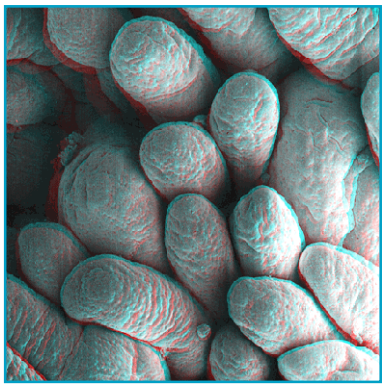
Referencias

1. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. J Immunol 1999; 163: 3202-3210.
2. Leithauser WMJ, Reimann J. The hepatic immune system. Crit Rev Immunol 2002; 22: 47-103
3. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev 2000; 174 :21-34
4. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, et al. The human liver contains multiple populations of NK Cells, T Cells, and $CD3^+CD56^+$ Natural T cells with distinct citotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. J Immunol 1999;163:2314-2321
5. Porcelli EM, Furman M, García J, Balk S. CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant Va24JaQ T cell receptor a chains. J Exp Med 1998;188: 867-876
6. Toyabe S, Seki S, Iiai T, et al. Requirement of IL-4 and liver $NK1^+$ T cells for Concenavalin A-induced hepatic injury in mice. J Immunol 1997;159:1537-1542
7. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. Journal of Autoimmune Diseases 2004, 1:2
8. Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. Autoimmunity Reviews 2004; 3: 207-214
9. Czaja AJ, Manns MP, McFarlane IG y Hoofnagle JH. Autoimmune hepatitis: The investigational and clinical challenges. Hepatology 2000; 31:1194-1200
10. Obermayer-Straub P, Strannburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. J Hepatol 2000; 32: 181-197
11. Cuarterolo M, Dávila M, Roig A, Mondiglio C, Sassone A, Ciocca M. Hepatitis autoinmune 8 años de experiencia. Medicina Infantil 1995; 2: 237-241
12. Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunological liver disease in children. Semin Liver Disease 1998;18:271-279
13. Knodell R, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981;1:431-435
14. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. Hepatology 1984; 19:1513-1520
15. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmnune hepatitis. J Hepatol 1999;31:929-938
16. Fainboim L, Marcos Y, Pando M, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children: Strong association with a particular HLA-DR6 (HLA-DRB1*1301) haplotype. Hum Immunol 1994; 41:146-150.
17. Pando M, Larriba J, Fernández G, et al. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. Hepatology 1999; 30: 1374-1380
18. Marcos Y, Fainboim HA, Capucchio M, et al. Two- locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis. Hepatology 1994; 19:1371-1374
19. Fainboim L, Cañero Velazco MC, Marcos Y, et al. Protracted, but not acute, Hepatitis A virus infection is strongly associated with HLA-DRB1*1301, a marker for pediatric autoimmune hepatitis. Hepatology 2001; 36: 1512-1517
20. Strassburg CP, Vogel A, Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. Autoimmunity Reviews 2003; 2: 322-331
21. Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. J Immunol 1999; 162: 2441-2447
22. Chang JT, Segal BM, Shevach EM. Role of costimulation in the induction of the IL-12/IL-12 receptor pathway and the development of autoimmunity. J Immunol 2000; 164:100-106
23. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. J Exp Med 1997; 185:817-824
24. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. Curr Opin Immunol 1998; 10: 259-264
25. Vergani D, Choudhuri K, Bogdanos DP, Mieli-Vergani G. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. Clin Liver Dis 2002; 6:439-449
26. Al-Khalidi JA, Czaja AJ. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis. Mayo Clin Proc 2001; 76:1237-52
27. Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoinmune hepatitis. Autoimmunity Reviews 2003; 2: 241-247
28. Cherñavsky AC, Paladino N, Rubio AE, et al. Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 conferes severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. Human Immunology 2004; 65: 683-691
29. Onu A, Pohl T, Krause H, Bulfone-Paus S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. J of Immunol 1997; 158: 255-263
30. Tanaka A, Iwabuchi Sh, Takatori M, et al. Clonotypic analysis of T cells in patients with autoimmune and viral hepatitis. Hepatology 1997; 25:1070-1076
31. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. Hepatology 1997; 25: 541 –547
32. Johnson PJ, McFarlane IG, Williams R. Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. N EnglJ Med 1995; 333: 958 –963
33. Alvarez F, Ciocca M, Canero-Velasco C, et al. Short term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. J Hepatol 1999; 30: 222 –227
34. Richardson PD, James PD, Ryder SD. Mycophenolate mofetil for maintenance of remission in autoimmune hepatitis in patients resistant to or intolerant of azathioprine. J Hepatol 2000; 33: 371 –375

27

B. ENFERMEDAD CELÍACA

Alejandra Cherñavsky
Julio Bai



La enfermedad celíaca es una enteropatía crónica de origen autoinmune, manifestada como una intolerancia dietaria permanente ante la ingesta de un grupo de proteínas denominadas prolaminas, presentes en los cereales. Derivados de estos alimentos, la gliadina es capaz de activar la respuesta inmune en estos pacientes y perpetuar el proceso autoinmune. El tratamiento consiste en la eliminación de las proteínas tóxicas de la dieta (o dieta libre de gluten), que provoca la recuperación de la mucosa intestinal en meses.

Contenido

Definición y descripción
Inmunopatogénesis
Enteropatías refractarias

Definición y descripción de la patología

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica descrita originalmente por S. Gee en el siglo pasado (1). Esta patología de origen autoinmune afecta tanto a individuos de temprana edad como a adultos. Se manifiesta como una intolerancia dietaria permanente ante la ingesta de un grupo de proteínas de reserva denominadas prolaminas, presentes en granos de trigo, cebada y centeno. Las alteraciones histológicas en la mucosa del intestino delgado se caracterizan por atrofia vellositaria, aumento en el número de linfocitos intraepiteliales (LIEs) y un denso infiltrado linfoplasmocitario de la lámina propia (LP). La presencia de estas características sumadas al estudio de los perfiles serológicos constituyen la base de su diagnóstico (2,3). El tratamiento de la EC consiste en la eliminación permanente de proteínas tóxicas de la dieta (dieta libre de gluten o DLG), que provoca la recuperación histológica de la mucosa intestinal en pocos meses.

Dieterich y col. (4) demostraron que el antígeno inmunoprecipitado por los anticuerpos séricos de tipo IgA en pacientes con EC es la enzima transglutaminasa tisular (tTG), cuya expresión se verifica en distintos tipos celulares, demostrándose luego que la tTG es el mayor autoantígeno reconocido por los anticuerpos específicos antiendomisio (EmA) (5,6).

Prevalencia y espectro clínico de la EC

La alta prevalencia de la EC alcanza a 1:100 individuos en diferentes poblaciones de amplias zonas geográficas de Europa, América y Asia donde se la ha estudiado (7). El amplio espectro clínico de esta patología se resume en la Tabla 1.

Al comienzo de los años 90, el amplio espectro de la EC condujo a su representación mediante el icono de un "iceberg" (8) donde la parte emergente sobre el nivel del agua (visible) lo constituye el pequeño porcentaje de casos sintomáticos y la mayor proporción de individuos se encuentra sumergida y por lo tanto no visible y está constituida por las formas leves y asintomáticas. De hecho, se ha sugerido la existencia de siete casos asintomáticos por cada caso diagnosticado (9). Un estudio multicéntrico realizado en Italia que involucró a cerca de 17.000 niños en edad escolar determinó la verdadera magnitud del "iceberg" donde sólo un 21% de los pacientes manifestaron síntomas de la enfermedad coincidentes con el momento de su diagnóstico, un 40% presentó características subclínicas y un 39% exhibió la forma silenciosa de la EC (10).

Historia natural y curso clínico de la EC

Se denomina *historia natural* de la EC a la evolución de la patología en ausencia de intervención médica. El *curso clínico* de la EC hace referencia a su evolución en presencia de tratamientos médicos. En términos generales, los pacientes con EC presentan mayor riesgo de mortalidad con relación a la población general, aunque una adecuada dieta restringida en gluten a largo plazo parece disminuir el riesgo. Existen muchas evidencias que indican que la injuria persistente de la mucosa intestinal conduce a complicaciones severas y a malignidad gastrointestinal (11). Se estima que un 10%-15% de los pacientes con EC desarrollan algún tipo de patología maligna en el curso de su vida (12), siendo las más frecuentes el linfoma intestinal, el carcinoma esofágico y el adenocarcinoma de intestino delgado. Las frecuencias precisas de este tipo de complicación son desconocidas dado que muchos pacientes presentan síntomas mínimos o EC silenciosa subdiagnosticada. El linfoma que más frecuentemente complica el curso de la EC se caracteriza por la presencia de LIEs de tipo monoclonal, y fenotipo $CD3^-$, $CD3\varepsilon^+$, $CD4^-$, $CD8^-$, y se denomina linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL) (13,14).

Enfermedades asociadas a la EC

La presencia de *anemia* es uno de los parámetros más útiles para el diagnóstico de la enfermedad subclínica y se demostró que un año de tratamiento (DLG) favorece la recuperación en un 94% de los pacientes (15). Otra consecuencia de la malabsorción es la enfermedad metabólica ósea con disminución de la masa ósea y un aumento en el riesgo de fracturas. La DLG tiende a revertir las alteraciones en la densidad ósea (16) y reducir el riego de fracturas.

Tabla 1. Características clínicas de la EC.

Clasificación	Características principales
EC latente	Histología intestinal normal. Se manifiesta en individuos con diagnóstico previo de EC, y que consumen una dieta completa.
EC clásica	Síntomas gastrointestinales característicos: diarrea, distensión y dolor abdominal, debilidad, edemas, anemia y alteraciones del metabolismo del calcio. Su aparición en niños es insidiosa, en adultos puede ser sorpresiva o posterior a la presencia de síntomas compatibles con EC.
EC subclínica	Sin síntomas gastrointestinales. Frecuentes manifestaciones extraintestinales: anemia, baja estatura (niños) y dermatitis herpetiforme (adultos). Clásicamente se ha considerado que los síntomas son consecuencia de la malabsorción y déficit nutricional. En la actualidad se sospecha la participación de fenómenos autoinmunes.
EC silenciosa	Enteropatía sensible a gluten, asintomática. Se detecta en el curso de programas de "screening" en grupos de individuos de riesgo (parientes de pacientes con EC de 1er ó 2do orden o pacientes con diversas patologías autoinmunes) o bien en la población general.

La piel y la mucosa oral son los sitios de lesión extragastrointestinal más frecuentemente afectados en pacientes con EC. La instauración de DLG revierte algunas de estas manifestaciones cutáneas tales como las lesiones psoriáticas y la alopecia. La dermatitis herpetiforme es otra de las manifestaciones cutáneas de la EC (17). Un 10% de pacientes con EC presentan disfunción neurológica asociada (18). Son habituales los problemas ginecológicos o de infertilidad. El embarazo y el puerperio pueden desencadenar el comienzo de la EC o afectar su curso (19). No se conoce la patogénesis de estos desórdenes reproductivos, sin embargo la DLG favorece su normalización.

Es posible que al momento del diagnóstico de la EC se detecten otros variados tipos de desórdenes autoinmunes asociados al entorno genético común: el sistema HLA. Son los más comunes la diabetes autoinmune tipo 1A, patologías tiroideas, neurológicas y hepáticas autoinmunes o el síndrome de Sjögren, etc. Dado que la DLG puede revertir algunas de las manifestaciones asociadas, se considera al gluten como su promotor directo o indirecto (20). Más aún, una exposición al gluten mayor a diez años aumenta la posibilidad de padecer patologías autoinmunes asociadas en pacientes subdiagnosticados (21).

Factores genéticos

La alta prevalencia de la enfermedad entre parientes de 1er grado de pacientes con EC y la alta tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos, indican que la susceptibilidad al desarrollo de la EC está fuertemente influenciada por factores genéticos. Más de un 95% de los pacientes poseen el haplotipo HLADRβ1*0301-DQ2 (DQA1*0501-B1*0201), mientras que la mayoría de los individuos restantes son heterocigotos HLADRβ1*11/12-DQA1*0505-DQB1*0301/DRβ1*07-DQA1*0201-DQB1*0202 portadores de los haplotipos DR5-DQ7 / DR7-DQ2 (22).

Factores ambientales

El gluten de la dieta es el factor antigénico ambiental más crítico hasta ahora reconocido. Se considera a la EC como un ejemplo excepcional de falta de tolerancia (constitucional o adquirida) a una proteína alimentaria en humanos. Para inducir la activación -patogénica- del sistema inmune adaptativo, ésta debe ser reconocida en el contexto de "señales de peligro". Las infecciones concomitantes del tracto digestivo son un estímulo de una respuesta innata. El tratamiento con interferón α induce la EC, por lo que infecciones virales concomitantes podrían contribuir a la iniciación de la enfermedad a través de la inducción de la liberación de interferón (23).

Debe destacarse que la alta concordancia observada en gemelos monocigóticos en comparación con otras patologías autoinmunes sugiere que la "señal de peligro" no siempre es provista por un segundo factor ambiental. Como fue demostrado recientemente, la gliadina posee, ella misma, capacidad de inducir completamente al sistema inmune (24), tal como se mencionará a continuación.

Inmunopatogénesis

Papel del gluten en la inmunopatogénesis de la EC

Actualmente se sabe que la gliadina activa ambas ramas de la respuesta inmune (innata y adaptativa). Como se mencionó más arriba, ciertos péptidos no inmunodominantes de gliadina inducen la respuesta innata mediada por IL-15 y la activación de células mononucleares en la LP que modulan la posterior respuesta adaptativa. Con respecto a esta última, diversos trabajos han permitido identificar y clonar linfocitos T (LT) provenientes tanto del compartimiento periférico como de biopsias de intestino delgado. El péptido que comprende los residuos aminoacídicos 31-49 de la A (agregable) α-gliadina es reconocido por clones T en el compartimiento periférico, y, por otro lado, posee demostrada capacidad de inducir daño histológico luego de su infusión intraduodenal. Se identificaron dos péptidos inmunodominantes reconocidos por clones T intestinales en el contexto de la molécula DQ2: residuos 62-75 y 57-68 de la α-gliadina, parcialmente superpuestos, que aumentan su antigenicidad luego de la deaminación en la posición 65. Así mismo, el péptido 57-73 de la α-gliadina parcialmente deaminado por tTG (Q65E) y restringido por DQ2 fue identificado como un factor inmunodominante que aparece en la periferia transitoriamente durante la respuesta ante la ingesta de gluten.

Pasos involucrados en el desencadenamiento de la EC

Los péptidos de gliadina resistentes a enzimas gástricas acceden al organismo a través del epitelio intestinal parcialmente dañado e hiperpermeable. La respuesta autoinmune se inicia en la LP del intestino delgado y está mediada principalmente por los LTCD4$^+$ activados por dichos péptidos. El pH ácido presente en la mucosa inflamada favorece la actividad de la enzima tTG: deamidación de péptidos de gliadina que potencia su antigenicidad. Como se ha mencionado, la tTG producida y liberada por fibroblastos, células inflamatorias y endoteliales, es el autoantígeno reconocido por los anticuerpos EmA con un alto grado de sensibilidad y especificidad. La respuesta inmune local involucra a LT, LB, monocitos y fibroblastos, y es amplificada por citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas que conducen al aumento del volumen de la mucosa y al aplanamiento de su superficie mediado por un disbalance en los niveles locales de proteasas y sus inhibidores (25), ver Figura 1. Si bien en la mucosa intestinal se detectan citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF-α, IL-12, IL-15), antiinflamatorias (TGF-β), de tipo Th1 (IFN-γ) o de tipo Th2 (IL-4, IL-10), los clones de LT CD4$^+$ gliadina-específicos aislados de las lesiones son Th1, y el IFN-γ es la citoquina predominantemente liberada (26). Por medio de un análisis de RT-PCR se determinó el mismo patrón de citoquinas dominantes en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (27).

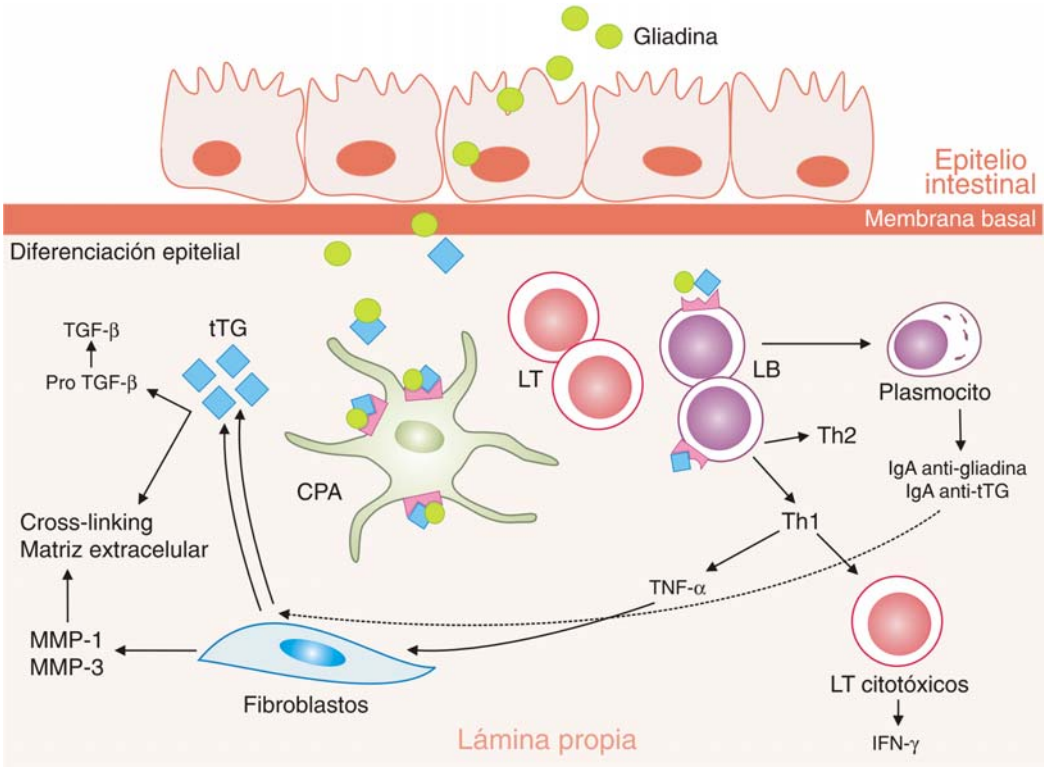


FIGURA 1.
Pasos involucrados en el desarrollo de la enfermedad celiaca.
Para una descripción más detallada ver texto. Abreviaciones: tTG: enzima transglutaminasa tisular; LT: linfocitos T; LB: linfocitos B; CPA: células presentadoras de antígenos; TNF alfa: factor de necrosis tumoral alfa; IFN: interferon; TGF-β: factor transformador del crecimiento beta; MMP: metaloproteasas de matriz.

Modelo "in vitro" de la EC

El desafío con gliadina a biopsias del intestino delgado provenientes de pacientes con EC en remisión cultivadas "in vitro", reproduce todas las características de la lesión celíaca: atrofia de la mucosa y liberación de anticuerpos EmA (28-30) durante las primeras 24 horas. Luego de la primera hora de cultivo, la gliadina induce aumento de la expresión de HLA-DR en enterocitos e ICAM-1 en células mononucleares de la LP seguida por la activación de LTCD4$^+$CD25$^+$ y la migración intraepitelial de LIEs αβ y γδ no activados (LIEs CD3$^+$CD8$^+$CD28$^-$CD25$^-$) (28). Si se interfiere con la activación de los LT CD4$^+$CD28$^+$ por bloqueo de la coestimulación, se interrumpe la producción de IFN-γ y de anticuerpos EmA inducidos por gliadina, pero no se impide ni la migración de los LIEs CD8$^+$ CD28$^-$ al epitelio ni la sobreexpresión de Fas en enterocitos, concluyéndose que los efectos de la gliadina son sólo en parte mediados por la activación de LT(30).

Papel de IL-15 en la patogénesis de la EC

Luego de tres horas de cultivo, la gliadina promueve un aumento de monocitos IL-15$^+$ en la LP. Esta citoquina induce la expresión de marcadores típicamente NK (CD94/NKG2 y NKG2D) en los LIEs αβ (31), y promueve la migración selectiva de LIEs γδ y CD94$^+$ hacia el epitelio (32). También modula una vía particular de coestimulación de los LIEs mediada por NKG2D (por ser CD28$^-$, los LIEs utilizan vías alternativas de coestimulación) promoviendo su diferenciación a células efectoras citotóxicas en la mucosa intestinal (33). Esto enfatiza el papel inmunopatogénico central de IL-15 en la EC.

MICA (cadena relacionada a moléculas de clase I no clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad) es una molécula censora de estrés inmunológico en el intestino (34). La expresión de MICA en la membrana de los enterocitos, es la señal reconocida por los LIEs γδ (o células NK) que expresan NKG2D dado que MICA es el ligando de NKG2D.

Papel de las moléculas coestimulatorias de LT en la EC

El programa genético que conduce la diferenciación de LT helper precursores hacia Th1 o Th2 es modulado por moléculas coestimulatorias, que constituyen la segunda señal para la activación de los LT. Estudios de ligamiento genético a nivel de la región 2q33 que contiene el gen del antígeno 4 de LT citotóxicos (CTLA-4) y CD28, determinaron una asociación entre diversos marcadores en esta región y la mayor susceptibilidad a la EC. Estos factores genéticos no ligados al sistema HLA, confieren también susceptibilidad a padecer EC. A diferencia de la región CTLA4/CD28, estudios de ligamiento de la región de CD80 (B7.1)/CD86(B7.2) evidenciaron ausencia de asociación con la mayor susceptibilidad a padecer EC, a pesar de que su importante papel en la activación de LT les confiere carácter de genes candidatos.

Enteropatías refractarias

Las "enteropatías refractarias" (ER) en términos generales presentan características clínicas e histológicas muy similares a la EC, pero a diferencia de ésta, no responden ante la DLG. Su tratamiento es empírico, con combinación de corticoides y/o agentes inmunosupresores que no siempre resultan efectivos (35). Una reciente clasificación de las ER (36) distingue tres grupos: a) enfermedad celíaca refractaria (ECR): pacientes que respondieron a la DLG y fueron diagnosticados con EC antes de su diagnóstico como refractarios, ó aquellos que responden a la DLG durante un enérgico tratamiento inmunosupresor, incluyendo pacientes con yeyunoileitis ulcerativa (YU) como complicación de su EC primaria, b) enfermedad refractaria *no celíaca* y c) enfermedad refractaria no clasificada.

Los pacientes con ECR tienen una alta tasa de mortalidad e incidencia de linfomas gastrointestinales, aunque sus mecanismos disparadores aún no se conocen (37). Los LIEs mono u oligoclonales presentes en el intestino delgado poseen el mismo fenotipo aberrante previamente mencionado en EATL, y en pacientes con YU. Por esta razón, este tipo particular de LIEs constituiría una población prelinfomatosa nexo entre ECR y sus complicaciones más comunes: EATL y YU (38). Sólo un 55% de los pacientes con ECR posee anticuerpos EmA, y un 92% posee HLA DQ2. En trabajos recientes se demostró que IL-15 promueve el desarrollo de poblaciones clonales de LIEs que provoca un desbalance en la homeostasis local e induce expresión de IFN-γ y potencial citotóxico favoreciendo el daño epitelial (39). A pesar del incremento en la proliferación celular del epitelio a nivel de las criptas dado por el aumento en el índice mitótico, el aplanamiento de la superficie de la mucosa en las lesiones intestinales no sería consecuencia de una menor tasa de división celular sino de un aumento en la pérdida de células. Dicha pérdida de células se produce a través del fenómeno de apoptosis o «muerte celular programada», un proceso fisiológico activo. En tejidos sujetos a un continuo recambio celular como es el epitelio intestinal, la homeostasis tisular está asociada al adecuado balance entre proliferación y apoptosis. Por medio de técnicas muy sensibles de marcación «in situ», recientemente se ha demostrado que la actividad apoptótica epitelial está incrementada en la mucosa de pacientes con EC activa y que la velocidad de pérdida de células excedería a la tasa de renovación celular (40). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido establecer si el aumento en la apoptosis es secundario al estado hiperproliferativo o si, alternativamente, el aumento en la muerte celular es el evento que desencadena el incremento en la proliferación celular. Evidencias experimentales demuestran que la actividad apoptótica epitelial podría ser consecuencia directa de los mayores niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias presentes en la mucosa intestinal de pacientes con EC. Diversas fracciones peptídicas de gliadina, cuyos efectos *in vivo* son citotóxicos, poseen efectos inductores de apoptosis en líneas celulares epiteliales en cultivo, por lo que no puede descartarse un efecto directo del gluten sobre el epitelio. Cualquiera que fuera la naturaleza del disparo proapoptótico y/o su origen, la susceptibilidad a la muerte de la célula epitelial blanco podría estar relacionada con un disbalance intracelular en la expresión de diferentes miembros de la familia de proteínas homólogas a Bcl-2 que poseen funciones promotoras o inhibitorias de la apoptosis. Se ha demostrado que la proteína proapoptótica Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) es la principal promotora de apoptosis en la célula epitelial normal y que su expresión es mayor en enterocitos de la mucosa intestinal de individuos con EC activa que en enterocitos de mucosa normal (41).

Conclusión

La EC es considerada como el resultado de un conjunto complejo de factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (ambientales). Es indiscutible que se trata de una patología autoinmune como lo reflejan su fuerte asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad y la presencia de autoanticuerpos altamente específicos. A pesar de los avances en el estudio y comprensión de su inmunopatogénesis, aún quedan pendientes interrogantes de relevancia práctica para el completo conocimiento de la patología y su terapéutica. Algunas de estas preguntas, actualmente en investigación, consisten en el estudio de otros genes predisponentes -diferentes a los del complejo mayor de histocompatibilidad- o la probable manipulación del sistema inmune y de los alimentos, tendiente a obtener tolerancia al gluten. También quedan aún por determinar los niveles mínimos de gluten que desencadenan la lesión de la mucosa y los eventos tempranos en el inicio de la patología en individuos genéticamente predispuestos. Finalmente, queda por establecerse si los programas de «screening» masivo y la instauración de dietas restringidas a individuos genéticamente predispuestos pero asintomáticos, podría ser capaz de prevenir el daño provocado por la malabsorción y el proceso autoinmune.

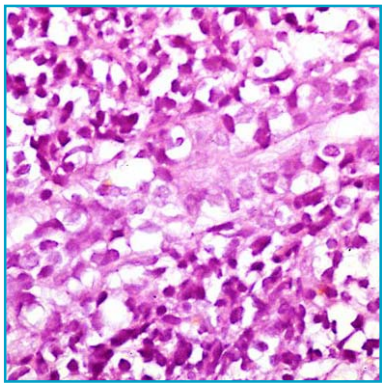
Referencias

1. Gee S. On the coeliac affection. Saint Bartholomew's Hospital reports 1888; 24: 17-20
2. Marsh MN. Gluten, MHC and the small intestine. Gastroenterol 1992; 102: 330-354
3. Maki M, Collin P. Coeliac Disease. The Lancet 1997; 349: 1755-1759.
4. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. Nature Med 1997; 3: 797-801
5. Dieterich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of coeliac disease. Gastroenterol 1998; 115: 1317-1321
6. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting coeliac disease. Gastroenterol 1998; 115: 1322-1328
7. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. Gastroenterol 2001; 120: 636-51
8. Logan RFA. Problems and pitfalls in epidemiological studies of coeliac disease. Dyn Nutr Res 1992; 2: 14-24
9. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age students. Acta Paedriatr 1996; 412 (suppl): 29-35
10. Sanderson IR, Walker A. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders. Gastroenterol 1993; 104: 622-639
11. Catassi C, Fabiani E, Corrao G, et al. Risk of Non-Lymphoma in Celiac Disease. JAMA 2002; 287:1413-1419
12. Holms GKT. Coeliac disease and malignancy. En: Maki M, Collin P, Visakorpi JK eds. Coeliac disease. Coeliac disease study group ed. Tampere 1997; 81-90
13. Cellier C, Patey N, Mauvieux L, et al. Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. Gastroenterol 1998; 114: 471-481
14. Mauriño E, Niveloni S, Cherñavsky A, et al. Azathioprine in refractory sprue: results from a prospective, open-label study. Am J Gastroenterol 2002; 97: 2595-2602
15. Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. Gut 2000 (suppl); 46: 1-5
16. Gonzalez D, Mazure R, Mautalen C, Vazquez H, Bai J. Body composition and Bone mineral density in untreated and treated patients with celiac disease. Bone 1995; 16: 231-234
17. Collin P, Reunala T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. Am J Clin Dermatol 2003; 4: 13-20
18. Cronin CC, Shanaham F. Exploring the iceberg –the spectrum of celiac disease. Am J Gastroenterol 2003; 98 518-520
19. Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynaecological history in celiac disease. Digestion 1994, 55: 24-36
20. Ventura A, Tomassini A, Trevisol C, et al. Celiac disease and autoimmunity. En: Auricchio S, Greco L, Maiuri L, Troncone R, eds. Proceedings of the 8th International Symposium on Coeliac Disease. Cap 19. JGC Editions, Naples; 2000: 143-150
21. Ventura A, Maguzzu G, Greco L, et al. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. Gastroenterology 1999; 117: 297-303
22. Sollid LM, Trosby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterol 1993; 105:910-922
23. Ammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. Lancet 1994; 343:1494-1495
24. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. The Lancet 2003; 362:30-37
25. Pender S, Tickle S, Docherty A, et al. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. J. Immunol 1998; 158:1582-1590
26. Molberg O, Kett K, Scott E, et al. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. Scand J Immunol 1997; 46: 103-109
27. Lahat N, Shapiro S, Karban A, et al. Cytokine profile in coeliac disease. Scand J Immunol 1999; 49, 441-446
28. Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, et al. Definition of the initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. Gastroenterol 1996; 110: 1368-1378
29. Picarelli A, Maiuri L, Frate A, et al. Lancet 1996; 348:1065-1067
30. Maiuri L, Auricchio S, Coletta S, et.al. Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. Gastroenterol 1998; 115: 564-572
31. Jabri B, Patey-Mariaud de Serre, Cellier Ch, et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. Gastroenterol 2000;118: 996-1006
32. Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, et al. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. Am J Gastroenterol 2001; 96:150-156
33. Roberts AI, Lee L, Schwartz E, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. J Immunol 2001; 167: 5527-5530
34. Groh V, Bahram S, Bauer S. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. PNAS 1996; 93:12445-12450
35. Rolny P, Sigurjonsdottir H, Remotti H, et al. Role of immunosuppressive therapy in refractory sprue-like disease. Am J Gastroenterol 1999; 94:219-225
36. Biagi F and Corazza GR. Characterizing one of the DQ2 candidate epitopes in coeliac disease: A-gliadin 51-70 toxicity assessed using an organ culture system. Eur JGastroenterol Hepatol 2001;13:561-565
37. Gale J, Simmonds P, Mead G, et al. Enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single center. J Clin Oncol 2000; 18:795-803
38. Bagdi E, Diss T, Muinson Ph, et al. Mucosal intra-epithelial lymphocytes in enteropathy-associated T-cell lymphoma, ulcerative jejunitis, and refractory celiac disease constitute a neoplastic population. Blood 1999; 94: 260-264
39. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterol 2003; 125: 730-745
40. Moss S, Attia L, Scholes V, et al. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. Gut 1996; 39: 811-817
41. Cherñavsky AC, Rubio AE, Vanzulli S, Rubinstein N, De Rosa S, Fainboim L. Evidences on the involvement of members of the bcl-2 family of proteins in active coeliac disease. Autoimmmunity 2002, 35: 29-37

27

C. CIRROSIS BILIAR PRIMARIA

Carlos A. Cañas D.
Diego F. Jiménez R.



Contenido

Epidemiología
Mecanismos de daño celular
- Agentes Infecciosos
- Autoanticuerpos
- Inmunidad celular

Clínica
Enfermedads asociadas
Diagnóstico
Tratamiento

La cirrosis biliar primaria es una enfermedad hepática de etiología no completamente conocida pero con un componente inmunológico muy importante y factores genéticos asociados. Se caracteriza por la aparición de inflamación con destrucción progresiva de los conductos biliares interlobares y septales, que conducen a colestasis crónica y en forma secundaria a cirrosis de origen biliar. En el presente capítulo se describen y analizan los principales aspectos inmunogenéticos, clínicos y terapéuticos de la enfermedad.

Introducción

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad hepática de etiología no completamente conocida pero con un componente inmunológico muy importante y factores genéticos asociados. Se caracteriza por la aparición de inflamación con destrucción progresiva de los conductos biliares interlobares y septales, que conducen a colestasis crónica y en forma secundaria a cirrosis de origen biliar.

El término "cirrosis biliar primaria" ha sido utilizado por muchas décadas; sin embargo, es fuente de confusión para pacientes y médicos, dado que al momento del diagnóstico muchos pacientes no tienen fibrosis estructurada en la biopsia.

Epidemiología

La CBP afecta a personas de todo el mundo, siendo un gran predominio en las mujeres, con una relación mujer – hombre de 9:1. La edad media de aparición es a los 50 años (rango de 20 a 90). Una incidencia anual estimada de 12 a 24 casos por millón, y una prevalencia entre 19 y 340 casos por millón de personas (1-2).

Aspectos genéticos

Diversos informes y series de casos, han identificado formas familiares de CBP. En un estudio realizado en el noreste de Inglaterra, se estimó que el riesgo relativo para que un familiar de primer grado de un paciente con CBP desarrolle la enfermedad era de 10.5, hallazgo cercano a lo observado en otras enfermedades autoinmunes (3). La interpretación lógica de esta observación sería que hay un componente de susceptibilidad genética para el desarrollo de CPB. Sin embargo, para algunos autores esto es cuestionable, en el sentido de que se deben excluir también factores ambientales, que pueden ser comunes en estos grupos (4). Los estudios en gemelos son escasos y se basan en informes de casos aislados (5).

Desde el punto de vista de los genes, no se ha definido un locus que se asocie significativamente con la CBP. Hay estudios que informan débiles asociaciones, con el inconveniente adicional de ser cohortes pequeñas de pacientes. Una aproximación más o menos convincente sería la asociación con *HLA DRB1*08*. En la Tabla 1 se resumen algunos trabajos donde se han encontrado asociaciones con la CBP (6-14).

Otros polimorfismos alélicos interesantes correspondientes a genes de CCR5, el de la resistencia a multimedicamentos-3 (MDR•3), receptor de la vitamina D (VDR), proteínas de matriz ósea, hormonas sexuales y sus receptores, así como los que indicarían respuesta o resistencia al ácido ursodesoxicólico (UDCA) (aspectos farmacogenéticos), serán estudiados seguramente en el futuro (15).

Mecanismos de daño celular

Los cambios histológicos vistos en el hígado en la CBP son altamente consistentes, lo que hace presumir de la existencia de unas vías muy precisas y repetibles, que llevan inicialmente al daño de las células epiteliales biliares

Tabla 1. Polimorfismos genéticos relacionados con la susceptibilidad para desarrollar CBP.

Genotipo	Tipo de asociación	País	Referencia
HLA DRB1*08	Positiva	Alemania	6
HLA DRB1*08	Positiva	Japón	7
HLA DRB1*0801	Positiva	Inglaterra	13
HLA DRB1*08-C4B2	Positiva	Inglaterra	11
HLA DRB1*08-C4Q0	Positiva	Alemania	12
HLA DRB1*0501	Positiva	Japón	8
HLA DQB1*0402	Negativa	Inglaterra	13
HLA DQA1*0102	Negativa	Alemania	6
HLA DRB1*11	Negativa	Italia	9
Polimorfismo Exón 1 CTLA-4	Positiva	Inglaterra	14
Polimorfismo de IL-1β	Positiva	Inglaterra	13

HLA: Antígeno leucocitario humano. CTLA-4: antígeno 4 asociado a LT citotóxicos. IL-1β: Interleuquina-1β.

(CEB), su destrucción y posterior desarrollo de fibrosis. El sitio donde se presenta dicho daño, es el epitelio de los ductos biliares pequeños intrahepáticos. La pérdida de dichos ductos es progresiva, y con el tiempo se desarrolla fibrosis y cirrosis biliar. El daño tisular es altamente restringido al hígado; extrahepáticamente lo más común es la presencia de síndrome de Sjögren, con afección de las glándulas salivares y lacrimales.

El daño ductal biliar se desarrolla en medio de un infiltrado linfocitario mononuclear. Las LT, predominantemente del tipo CD8+, se ubican en áreas periductales (16). En dicho infiltrado también hay un gran número de eosinófilos, principalmente en las etapas tempranas de la enfermedad. La expresión de citoquinas de tipo *Th1* (Interferón -γ) y *Th2* (IL-4 e IL-5), han sido informadas (17).

La dirección que se ha tomado en los últimos 20 años para el estudio de la patogénesis de la CBP, ha sido influenciada por la presencia constante en los pacientes de altos títulos de anticuerpos dirigidos contra antígenos altamente conservados expresados a nivel mitocondrial (anticuerpos antimitocondriales - AMAs). Estos autoantígenos pertenecen principalmente al "complejo piruvato dehidrogenasa" (PDC). Una de las paradojas en la CBP, es que es una enfermedad con una distribución de afección tisular muy limitada, con un autoantígeno aparentemente bien definido, siendo ubicua su presencia en el organismo.

Se ha postulado que las CEB y las células epiteliales salivares sufren unos cambios fenotípicos, expresando en su superficie autoantígenos del tipo PDC (18). El PDC es normalmente restringido en su expresión a la membrana interna mitocondrial. La expresión a nivel de la membrana de los PDCs parece ser un factor desencadenante de la respuesta inmune, tanto de tipo celular como humoral.

Una vez se genera la reacción inflamatoria las CEB mueren, posiblemente, por inducción de apoptosis, al considerar los hallazgos de fragmentación del DNA, presencia de antígeno Fas, expresión de bax y bcl-x (19). Tam-

bién se ha notado la disminución de la expresión del bcl-2, conocido factor antiapoptótico (20). La presencia de granzima-B y Fas-ligando en las células mononucleares apreciables por inmunohistoquímica (21), y la demostración de función citotóxicas in vitro de células CD8+ aisladas de muestras tisulares de pacientes con CBP (22), son hechos sugestivos de que la señal proapoptótica inducida a las CEB es generada en las células citotóxicas efectoras (Figura 1).

Agentes Infecciosos

Por las características epidemiológicas de la CBP, se puede inferir que existe un factor ambiental que participa en su patogénesis. Un agente infeccioso es un candidato obvio. En teoría, dicho agente contribuiría por dos mecanismos: uno directo, como factor patogénico o infeccioso de las CEB induciendo su daño y generando una respuesta inmune; uno indirecto, al inducir una respuesta de autoinmunidad. Varios aspectos que hacen presumir la presencia de infección en el desarrollo de la CBP, se describen en la Tabla 2 (23-30).

Autoanticuerpos

Casi todos los pacientes con CBP tienen AMAs. Desde los años sesenta, se identificaron estos anticuerpos que están dirigidos a antígenos sensibles a tripsina, localizados en la membrana interna mitocondrial (31). Posteriormente, en los años ochenta, varios grupos de investigadores demostraron que los AMAS se dirigían a autoantígenos mitocondriales con pesos moleculares de 36 a 74 kDa (32-35). Hacia final de los años ochenta y principio de los noventa, se logra la clonación de cDNA para el mayor autoantígeno mitocondrial, identificando la proteína como una subunidad del complejo 2-oxo acil dehydrogenasa (36-39). La enzima cataliza la transferencia de un grupo acetil- desde el sustrato, a coenzima A para oxidación en el ciclo de Krebs.

Los complejos multidominios hacia los cuales se dirigen los AMAs, tienen subunidades conocidas como E1, E2 y E3. La subunidad E1, corresponde a piruvato dehidrogenasa, la E2 a dihidrolipoamida acetiltransferasa, y la E3, a dihidrolipoamida dehidrogenasa (40). Los complejos multidominios identificados son:

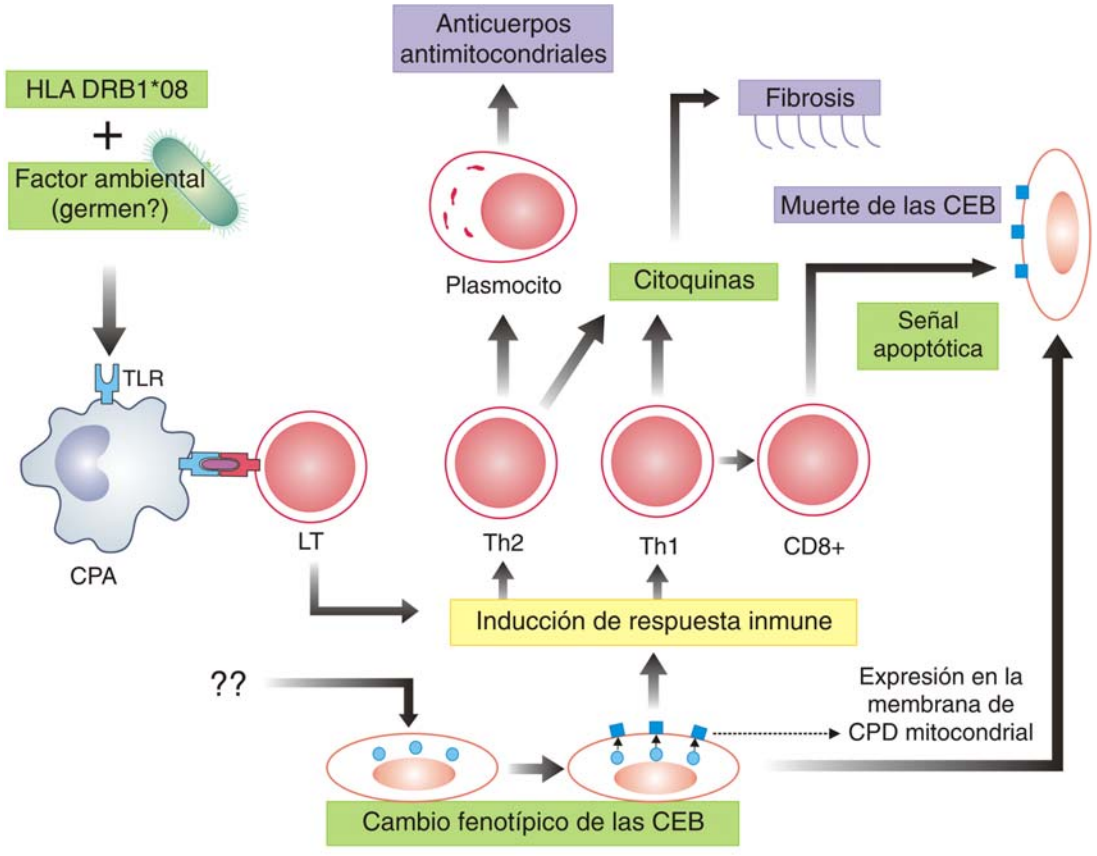


FIGURA 1.

Mecanismos propuestos para el daño de las células epiteliales biliares (CEB) en la CBP.

Un individuo con predisposición genética, como la presencia del gen del antígeno leucocitario humano (HLA) – DRB1*08, ante la presencia de un estímulo ambiental (germen?), desencadena por parte de algunas células de presentación antigénica (CPA), la presentación a LT (LT), de antígenos. Se induce una respuesta inmune al activarse LT CD4+ (Th1 y Th2) y CD8+, con la consecuente amplificación de la inmunidad celular, y producción de citoquinas; y la humoral, con la síntesis de autoanticuerpos (anticuerpos antimitocondriales). Las consecuencias finales son el desarrollo de muerte de las CEB y fibrosis. Los anticuerpos antimitocondriales son dirigidos entre otros al "complejo piruvato dehidrogenasa" (PDC), el cual se encuentra en la mitocondria y se expresa por razones desconocidas en la membrana celular de las CEB.

Tabla 2. Aspectos que soportan la presencia de infección en pacientes con CBP.

Tipo de Germen	Aspecto estudiado	Referencia
Bacterias Gram positivas	Frecuencia alta de infecciones urinarias	23
	Células fagocíticas que contienen ácido lipoteicoico	25
	MCP-2 y MCP-3, en los infiltrados de células mononucleares del tracto porta	26
E. coli	Reacción cruzada de clones de LT con péptidos bacterianos y autoantígenos	24
Chlamydia pneumoniae	Antígeno específico de la *Chlamydia pneumoniae* en muestras de tejido hepático	27
Retrovirus	Reactividad de anticuerpos contra antígenos retrovirales	28
	Partículas virales en el epitelio biliar por microscopía electrónica	29
	Secuencias de nucleótidos específicos retrovirales	30

MCP: Proteína quimiotáctica de los monocitos.

- Complejo piruvato dehidrogenasa (PDC): con subunidades E1α, E1β, E2 y E3. La subunidad E2 está relacionada con la proteína "E3 binding protein" (E3BP), y la subunidad E3. Con esta última se une a través de un "dominio de unión" rico en alanina y prolina con actividad catalítica.
- Complejo oxoglutarato dehidrogenasa (OGDC): con subunidades E1α, E1β, E2 y E3. No se relaciona con la E3BP.
- Complejo oxoácido ramificador dehidrogenasa (BCO ADC): con subunidades E1α, E1β, E2 y E3. No se relaciona con la E3BP.

El AMA más frecuentemente encontrado en pacientes con CBP es el dirigido contra las subunidades E2, E3 y la E3BP del PDC (41). Estos anticuerpos se encuentran en prácticamente el 100% de los pacientes. Del 10 al 40% de estos pacientes tienen anticuerpos contra las subunidades E1α y E1β del PDC, el 90% contra la subunidad E2 del OGDC, y el 50% contra la subunidad E2 del BCOADC (42,43).

La subunidad E2 de todos los complejos y la E3BP tienen varios dominios, los cuales se unen por regiones flexibles de polipéptidos ricos en alanina y prolina. Tal flexibilidad es necesaria para la función catalítica del complejo. Tanto la subunidad E2 como la E3BP, tienen una región central responsable para la unión de otro polipéptido E2/E3BP. La región aminoterminal de estos polipéptidos, son dominios compactos covalentemente unidos con un cofactor de ácido lipóico (44). La subunidad E2 del PDC contiene dos dominios lipoil-, mientras que la E3BP contiene sólo uno. Los residuos lipoil- explican la antigenicidad de estas moléculas. Su estructura tridimensional ya ha sido determinada (45).

En la CBP fuera de los AMAs, también se han descrito anticuerpos antinucleares (ANAs) específicos. Cerca del 50% de los pacientes tienen ANAs positivos. Se han identificado dos autoanticuerpos que reconocen proteínas del núcleo. Unos dirigido contra una proteína de la membrana nuclear, más específicamente en los poros que comunican el interior del núcleo con el citoplasma, la gp210; otros dirigidos contra la proteína sp100 del cuerpo nuclear.

La proteína gp210, se encuentra en el complejo proteico de los poros de la membrana nuclear, de unos 200 kDa, tiene un dominio extranuclear de 1808 aminoácidos, una porción transmembrana y un dominio intracelular de 58 aminoácidos, el cual se fosforila durante la mitosis (46).En este dominio intranuclear se encuentra un epítope de 58 aminoácidos contra el cual está dirigido el anticuerpo (47). Los anti- gp210 se encuentran entre el 9.5 y 41% de los pacientes con CBP, con una especificidad del 99% (48). En la inmunofluorescencia indirecta se aprecia un patrón punteado fino, si el núcleo es observado en su diámetro más largo, y un patrón de anillo perinuclear discontinuo, si el núcleo es observado en su diámetro menor (49) (Figura 2).

Los anticuerpos dirigidos contra los cuerpos nucleares (anti sp100), se encuentran entre el 18 y 44% de los pacientes con CBP, siendo altamente específicos (50). Los cuerpos nucleares son complejos multiprotéicos que han sido observados en todas las líneas celulares mamíferas. Son entre 10 y 30 por núcleo, con un tamaño entre 0.2 y 1 µm. La proteína reconocida por los autoanticuerpos observados en la CBP tiene un peso de 100 kDa (51). Su función no es clara, pero puede estar relacionada con fenómenos de diferenciación o crecimiento. Cuando son observadas por inmunofluorescencia, estos autoanticuerpos generan un patrón punteado.

Otros tipos de ANAs reconocidos en pacientes con CBP, son dirigidos contra diferentes autoantígenos: LBR (proteína relacionada con la membrana interna nuclear) (52), PLM (proteína de los cuerpos nucleares) (53), p62 (del complejo de proteínas de los poros de membrana nuclear) (54) y anhidrasa carbónica II (55).

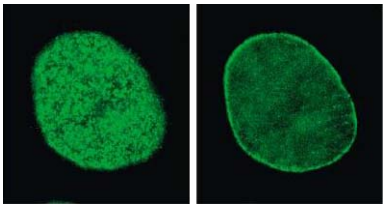


Figura 2.
Inmunofluorescencia indirecta.
Usando células HeLa humanas y suero de pacientes con CPB, se aprecia un patrón punteado fino si el núcleo es observado en su diámetro más largo (imagen izquierda), y un patrón de anillo perinuclear discontinuo si el núcleo es observado en su diámetro menor (imagen derecha). Estos ANAs están dirigidos contra la proteína gp210 de los poros de la membrana nuclear. Tomado y modificado de Worman HJ, Courvalin JC (Ref 49).

Inmunidad celular

La participación de la inmunidad celular en la génesis de la CBP es crucial. Un infiltrado importante de linfocitos T (LT) se encuentran en las lesiones hepáticas, principalmente alrededor de los ductus biliares, e incluso se han identificado invadiendo el epitelio, vecinos a CEB con cambios patológicos (56).

Los LT posiblemente juegan un papel a través de mecanismos de citotoxicidad. El infiltrado de LT es mixto, tanto de CD4+ como CD8+. Se han identificado citoquinas tanto del tipo Th1 como del tipo Th2, tal como se había anotado, con preponderancia del primero, lo que hace presumir una mayor participación del componente celular inmune (57,58). Estos estudios se realizan midiendo los niveles de expresión de mRNA.

Para llegar a la activación de los LT, es necesaria la presentación antigénica. En las lesiones hepáticas de la CBP, se han identificado células presentadoras de antígeno, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, receptores de LT, moléculas de coestimulación, moléculas de adhesión, al igual que una expresión "aberrante" de PDC-E2.

Determinantes antigénicos reconocidos por las LT, interesantemente corresponden a los que reconocen también los AMAs. Dichos determinantes se encuentran en los dominios lipoil- del PDC-E2. El distintivo es la presencia de aminoácidos esenciales comunes en los epítopes. Por ejemplo, ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y lisina (K) en posiciones 170, 172 y 173, respectivamente (60). Una secuencia mínima reconocida de los aminoácidos 163 al 176 es: GDLLAEIETDKATI. Más interesante aún cuando se ha encontrado que secuencias ExDK de péptidos bacterianos como *E. Coli*, son reconocidos por LT de pacientes con CBP, lo que podría apoyar una teoría de mimetismo molecular (61).

Características clínicas

Enfermedad asintomática

El diagnóstico de la CBP en nuestra época es mucho más temprano debido al amplio uso de pruebas de laboratorio de tamizaje, lo cual ha hecho que en el diagnóstico por primera vez en la CBP hasta el 20 – 60% de los individuos se encuentren asintomáticos (62). La sospecha clínica se basa en el hallazgo de niveles séricos elevados de FA o AMAs solicitados como parte del estudio de otra enfermedad autoinmune no hepática.

Muchos individuos sin síntomas ni alteraciones bioquímicas importantes tienen AMAs presentes, y cursan con características consistentes con CBP en la biopsia hepática. Muchos de estos pacientes desarrollan con el tiempo síntomas clínicos de colestasis.

Enfermedad sintomática

Los síntomas más frecuentes son la astenia y la adinamia, que se encuentran hasta en las dos terceras partes de los pacientes al momento del diagnóstico. El siguiente síntoma predominante es el prurito, el cual se puede presentar en cualquier momento de la enfermedad y se caracteriza por ser intermitente durante el día y mucho mas molesto en la noche. El prurito no se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. La ictericia ocurre frecuentemente en etapas tardías de la enfermedad, y si se hace persistente se convierte en un síntoma de pobre pronóstico; la hiperpigmentación cutánea, la hepatoesplenomegalia y los xantelasmas (depósitos cutáneos de colesterol), se encuentran frecuentemente en el examen físico de individuos con CBP en etapas intermedias; también se encuentran síntomas asociados al desarrollo de otras enfermedades inmunológicas concomitantes tales como artritis, queratoconjuntivitis seca, esclerodermia y fenómeno de Raynaud. En etapas avanzadas de la enfermedad aparecerán los signos característicos del compromiso hepático extenso como son la ascitis, encefalopatía y signos de hipertensión portal (Tabla 3) (63).

Enfermedades asociadas

Gran parte de las enfermedades asociadas con la CBP se relacionan con fenómenos de autoinmunidad, tales como los indicados en la Tabla 4 (64).

Parece existir además un incremento en la incidencia de neoplasias en los pacientes que cursan con CBP. En algunos estudios se ha encontrado un mayor riesgo de cáncer de seno (65,66), que no pudo confirmarse en trabajos más grandes (67). El carcinoma hepatocelular que antes se creía no afectaba a estos pacientes muestra una preva-

Tabla 3. Síntomas y signos de la CBP al momento del diagnóstico.

Hallazgos	Frecuencia (%)
Fatiga hepática	65 – 70%
Prurito	55 – 65%
Ictericia	10%
Hiperpigmentación	25%
Hepatomegalia	25%
Esplenomegalia	15%
Xantelasma	10%
Asintomático	25%

Tabla 4. Enfermedades asociadas con la CBP.

Enfermedad	Frecuencia (%)
Queratoconjuntivitis seca	72 – 100%
Artritis / Artropatía	40 – 42%
Esclerosis Sistémica	3 – 4%
CREST	7%
Fenómeno de Raynaud	8%
Tiroiditis autoinmune	15 – 20%
Desordenes cutáneos (líquen plano, lupus discoide, penfigoide)	11%
Acidosis tubular renal	50 – 60%
Colelitiasis	33%
Carcinoma hepatocelular	1 – 2%

lencia incluso cercana a la encontrada en cirróticos de etiología viral (68).

El 70% de los pacientes con CBP tienen osteopenia y el 11% cursan con osteoporosis. El origen de la enfermedad parece estar dado principalmente por la formación de hueso; sin embargo, los últimos estudios mencionan también la presencia de alteraciones en la regulación del recambio óseo a través de los osteoclastos por alteraciones en la osteoprotegerina y su ligando (RANKL) (69).

Las deficiencias de vitaminas A, D, E y K se presentan en pacientes con CBP, y sus manifestaciones clínicas son infrecuentes. La deficiencia sintomática de vitamina E es rara pero grave, en el sentido que puede manifestarse como ataxia o alteraciones en los cordones posteriores de la médula espinal y que la suplencia vitamínica no es totalmente efectiva cuando se ha desarrollado el daño (70).

Diagnóstico

Características bioquímicas

En la CBP se observa un patrón de colestasis, con incremento en los niveles séricos de FA entre 2 a 10 veces por encima del límite normal, al igual que la gamaglutamil transpeptidasa (GGT). Los niveles de bilirrubina son usualmente normales en las etapas tempranas de la enfermedad, y se ve un incremento paulatino a través de los años.

El tiempo de protrombina (PT) prolongado puede indicar mala absorción de vitamina K o CBP avanzada. La hipercolesterolemia puede presentarse en el 85% de los pacientes al momento del diagnóstico y frecuentemente encontramos en forma característica niveles séricos elevados de IgM (71).

Características serológicas

Entre el 90 – 95% de los pacientes con CBP tienen AMAs positivos al momento del diagnóstico, en títulos iguales o superiores a 1/40 (72). Los ANAs se encuentran positivos en un porcentaje importante de casos (73). Los pacientes que cursan con CREST (Calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia) tiene ANAs con patrón anticentrómero (74). Otros autoanticuerpos observados son: factor reumatoideo (70%), anticuerpos antitiroideos (40%), antimúsculo liso (35%). La falta de positividad para AMAs en pacientes con características clínicas que sugieren la enfermedad, se ha llamado "colangitis autoinmune" (75). La historia natural de estos casos es similar a los pacientes con CBP y AMAs positivos (76).

Características imagenológicas

Los estudios imagenológicos están orientados a descartar colestasis de origen extrahepático. La utrasonografía da una buena sensibilidad y especificidad para aclarar este punto. Otros estudios, como la tomografía axial computarizada y la resonancia nuclear magnética, brindan poca información adicional, pero pueden ser útiles en situaciones en que se desee evaluar hipertensión portal o cuando hay dudas en relación a la presencia de neoplasia asociada. Igualmente, con estas técnicas de imagen es posible identificar adenopatías en el hilio hepático, las cuales son frecuentes en pacientes con CBP y no hablan necesariamente de neoplasia asociada.

Características histológicas

La utilidad de la biopsia hepática es cuestionable en esta enfermedad; sin embargo, se considera indispensable en el diagnóstico de CBP con AMAs negativos, y es útil para estadificar la enfermedad, lo cual tiene un valor pronóstico. La clasificación histológica más utilizada es la de Ludwig. En el *estadío I* existe destrucción inflamatoria de los septos intrahepáticos y los conductos biliares interlobares, hasta de un diámetro de 100 μm; los espacios porta igualmente están invadidos por linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. En el *estadío II* la inflamación se extiende desde los espacios porta hacia el parénquima en una lesión llamada hepatitis de interfase (anteriormente llamada "piecemeal necrosis"); adicionalmente se aprecia colangitis y granulomas. El *estadío III* se caracteriza por cirrosis septal o en puentes, con ductopenia resultante en colestasis y aumento de los depósitos de cobre alrededor del espacio porta y los hepatocitos paraseptales. En el *estadío IV* se encuentra una cirrosis estructurada con septos fibrosos y nódulos de regeneración (78).

Historia natural

La CBP se caracteriza por progresión lenta de la colestasis con inflamación hepática progresiva hasta el desarrollo de fibrosis completa y sus complicaciones asociadas. Los pacientes asintomáticos tienen una sobrevida mayor que la de los pacientes sintomáticos, sin embargo, su expecta-

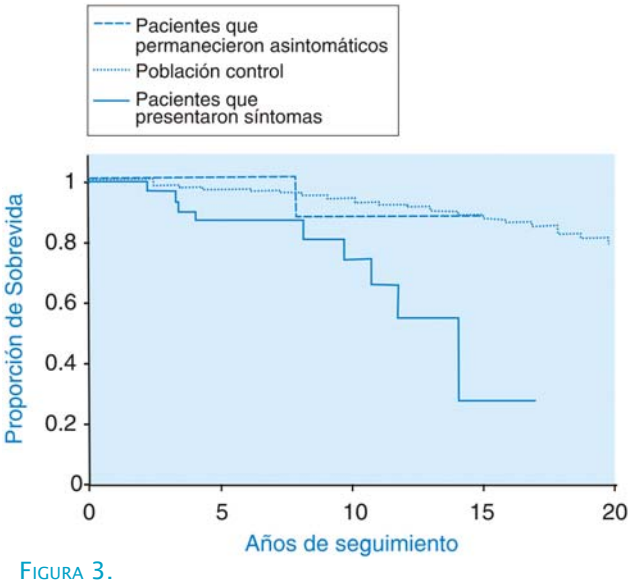


FIGURA 3.
Curva de Kaplan-Meier.
Se observa la sobrevida de los pacientes asintomáticos y sintomáticos al inicio de la enfermedad en relación con grupo control sano apareado por edad y género (Ref. 79).

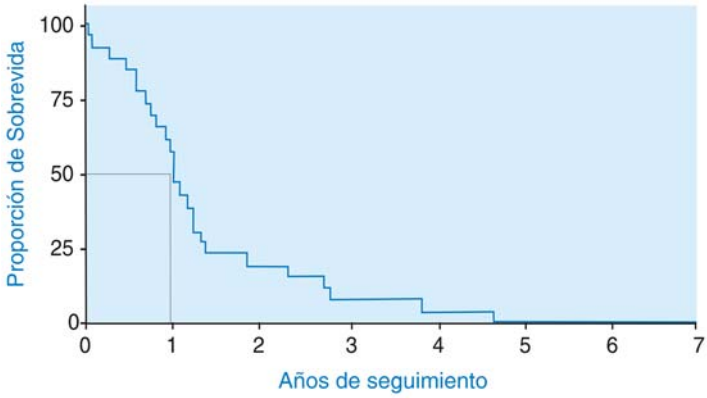


FIGURA 4.
Sobrevida actuarial para pacientes con CBP que desarrollan niveles de bilirrubinas por encima de 15 mg/dl.
(Ref.80)

tiva de vida es menor que la de sujetos sanos. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan aproximadamente en el 40% de los pacientes en el curso de 5 a 7 años de seguimiento, y una vez se desarrollan, la expectativa de vida se reduce significativamente, con una sobrevida media de aproximadamente 10 años (Figura 3) (79).

Entre los marcadores que influencian la sobrevida tenemos: edad avanzada, niveles de bilirrubina séricas elevados, alteración de la función sintética hepática, aumento del tamaño hepático, ascitis, sangrado varicial y estadío III o IV en la biopsia hepática. Uno de los mejores predictores de la sobrevida es el nivel de bilirrubina (Figura 4) (80).

Tratamiento farmacológico

Existe una variedad de medicamentos que se han utilizado en CBP, con resultados contradictorios, poco definidos, con poco o ningún efecto sobre la mejoría sintomática o retardo para la decisión de realizar transplante hepático. Los medicamentos más utilizados han sido: azatioprina (81,82), D-penicilamina (83), colchicina (84), metotrexate (85-87), glucocorticoides (88,89), ciclosporina (90,91). El UDCA, es un epímero del quenodesoxicólico y es la droga más evaluada en el tratamiento de CBP. En el momento es la única medicación aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), para el tratamiento de la CBP. Los mecanismos propuestos para su acción incluyen inhibición de la absorción intestinal de sales biliares tóxicas endógenas, estabilización de la membrana del hepatocito y reemplazo de los ácidos biliares endógenos, los cuales tienen capacidad hepatotóxica, así mismo, reducción en la expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II, en el epitelio biliar. El uso de esta medicación ha sido ampliamente aceptado por su poca toxicidad y fácil cumplimiento por parte de los pacientes, además de la rápida mejoría en el perfil bioquímico del hígado (92-94). Adicionalmente, no se ha demostrado ningún beneficio con el uso de terapias combinadas.

Tratamiento quirúrgico (trasplante hepático)

El trasplante continúa siendo la única herramienta útil en el tratamiento de esta enfermedad y es una de las principales indicaciones de este tratamiento en el mundo. En nuestro grupo la CBP es la 3ª causa de trasplante. Las indicaciones son las mismas que para otras etiologías de cirrosis. El momento óptimo para el trasplante se define cuando la probabilidad de sobrevida sin trasplante es menor que con la realización de éste, lo cual generalmente se correlaciona con niveles séricos de bilirrubina por encima de 10 mg/dL (95), y la decisión se apoya con la utilización de los modelos matemáticos disponibles para predecir sobrevida (96). La sobrevida de los injertos es excelente y frecuentemente mejor que para otras indicaciones, aproximándose al 92 % a un año y 85 % a 5 años (97).

Referencias

1. Prince MI, Chetwynd A, Diggle P, et al. The geographical distribution of primary biliary cirrhosis in a well-defined cohort. Hepatology 2001; 34: 1083–88
2. Metcalf JV, Bhopal RS, Gray J, et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in the city of Newcastle upon Tyne, England. Int J Epidemiol 1997; 26: 830–36
3. Jones DE, Watt FE, Metcalf JV, et al. Familiar primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study. J Hepatol 1999;30:402-407
4. Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2003;39:639-648
5. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Ocurrence of primary biliary cirrhosis in monozygotic twins. Hepatology 2002;36:387A
6. Begovitch AB, Klitz W, Moonsamy PV, et al. Genes within the HLA class II region confer both predisposition and resistance to primary biliary cirrhosis. Tissue Antigens 1994;43:71-77
7. Maeda T, Onishi S, Saibara T, et al. HLADR8 and primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1992;1118-1119
8. Seki T, Kiyosawa K, Ota M, et al. Association of primary biliary cirrhosis with human leukocyte antigen DRB1*0501 in Japanese patients. Hepatology 1993;18:73-78
9. Invernizzi P, Barttezzati PM, Crosignani A, et al . Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2003;38:401-406
10. Briggs DC, Donaldson PT, Hayes P, et al. A major histocompatibility complex class III allotype C4B2 associated with primary biliary cirrhosis. Tissue Antigens 1987; 29:141-145
11. Mehal WZ, Gregory WL, Lo YM, et al. Defining the immunogenetic susceptibility to primary biliary cirrhosis Hepatology 1994; 5:1213-1219
12. Manns M, Krüger M. Immunogenetics in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1994;106:1676-1697
13. Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, et al. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. Gut 2001;48:397-402
14. Baragiotta A, Agarwal K, Florean A, et al. Is the cytotoxin T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism a susceptibility locus for primary biliary cirrhosis (abstract). Gut 2001;49 (Suppl 3)
15. Bregaza NV, Mason A, Florean A, et al. Primary biliary cirrhosis: report of a focus study group. Hepatology 2004; 40:1013-1020
16. Bjorkland A, Loof L, Mendel-Hartvig I, et al. Primary biliary cirrhosis: High proportion of B-cells in blood and liver tissue produce anti-

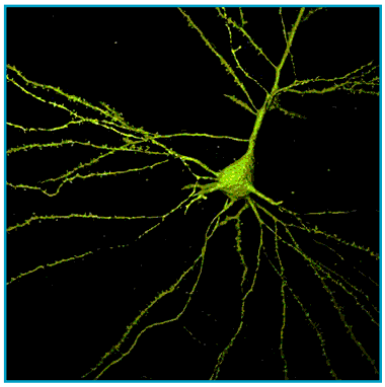
mitochondrial antibodies of several Ig classes. J Immunol 1994; 153:2750-2757
17. Harada K, Van de Water J, Leung PS, et al. In situ nucleic acid hybridisation of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. Hepatology 1997;25:791-796
18. Joplin R, Gershwin ME. Ductal expression of autoantigens in primary biliary cirrhosis. Semin Liver Dis 1997;17:97-103
19. Tinmouth J, Lee M, Wanless IR, et al. Apoptosis of biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis. Liver 202; 22:228-234
20. Iwata M, Harada K, Kono N, et al. Expresión of Bcl-2 familial protein is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. Hum Pathol 2000;31:179-84
21. Iwata M, Harada K, Hiramatsu K, et al. Fas ligand expressing mononuclear cells around intrahepatic bile ducts co-express CD68 in primary biliary cirrhosis. Liver 2000;21:129-135
22. Kita H, Matsumura S, He X, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. J Clin Invest 2002;109:1231-1240
23. Parikh-Patel A, Gold EB, Wormann H, et al. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the United States. Hepatology 2001;33:16-21
24. Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S, et al. T cell immunity and primary biliary cirrhosis. Autommunity Review 2003;2:19-24
25. Tsuneyama K, Harada K, Kono N, et al. Scavenger cells with gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2001; 35:156-163
26. TsuneyamaK, Harada K, Yasoshima M, et al. Monocyte chemotactic protein-1,-2, and –3 are distinctively expressed in portal tracts and granulomata in primary biliary cirrhosis: implications for pathogenesis. J Pathol 2001;193:102-109
27. Abdulkarim AS, Petrovic LM, Kim WR, et al. Primary biliary cirrhosis: an infectious disease caused by chlamydia pneumoniae. Gastroenterology 2002;122:A641
28. Mason Al, Xu L, Guo L, Muñoz S, et al. Detection of retroviral antibodies in primary biliary cirrhosis and other idiopathic liver disorders Lancet 1998;351: 1620-4
29. Xu L, Shen Z, Guo L, et al. Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis?. Proc Natl Acad Sci (USA) 2003;100:8454-59
30. Mason AL, Xu L, Guo L, et al. Retroviruses in autoimmune liver disease: genetic or environmental agents. Arch Immunol Ther Exp 1999;47:289-297
31. Berg PA, Doniach D, Roitt IM. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. Localization of the antigen to mitochondrial membrane. J Exp Med 1967; 126:277-290.
32. Ishis BH, Saifuku K, Namihisa T. Multiplicity of mitochondrial inner membrane antigens from beef heart with antimitochondrial antibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis. Immunol Lett 1985;9:325-330.
33. Frazer IH, Mackay IR, Jordan TW, et al. Reactivity of antimitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens. J Immunol 1985;135:1739-45.
34. Manns MP, Gerken G, Meuer M, et al. Characterization of primary biliary cirrhosis specific mitochondrial determinant by immunoblotting. J Hepatol 1985;1:S85
35. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. Further characterization of the M2 antigen determinants. Hepatology 1985;5:763-769
36. Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kD mitochondrial autoantigen recognized in primary biliary cirrhosis. J Immunol 1987;138:3525-3531
37. Yeaman SJ, Danner DJ, mutimer DJ, et al. Primary biliary cirrhosis: Identification of two mayor M2 mitochondrial autoantigens. Lancet 1988; 1:1067-1070
38. Surh CD, Danner DJ, Ahmend A, et al. Reactivity of PBC sera with a human fetal liver cDNA clone of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase dihydroprolipoamide acyltransferase, the 52 Kd motochondrial autoantigen. Hepatology 1989;9:63-68
39. Moteki S, Leung P, Dickson ER. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. Hepatology 1996;23:436-444
40. Jones DEJ. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2003;39:639-648
41. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, et al. Primary biliary cirrhosis: Identification of two mayor M2 mitochondrial autoantigens. Lancet 1988;1967-1070
42. Fussey SPM, Guest JR, James OFW, et al. Identification and analysis of the mayor M autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc Natl Acad Sci (USA) 1988;85:8654-58
43. Surh CD, Danner DJ, Ahmer A, et al. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA cone of branched-chain a-keto acid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kDa mitochondrial autoantigen. Hepatology 1989;9:63-68
44. Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationship in dihydrolipoamide acyltransferase. J Biol Chem 1990;265:8971-8974
45. Howard MJ, Fuller C, Broadhurdt RW RN, et al. Three dimensional structure of mayor autoantigen in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1998;115:139-146
46. Gerace L, Ottaviano Y, Kondor-Koch C. Identification of a major polypeptide of nuclear pore complex. J Cell Biol 1982; 95:826-837
47. Wzniak RW, Bartnik E, Blobel G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. J Cell Biol 1989;108:2083-2092
48. Nickowitz RE, WozniakRW, Schaffner F, et al. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1994;106:193-199
49. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. Autoimmunity Reviews 2003; 2:211-217
50. Zuchner D, Sternsdorf T, Szostecki C, et al. Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukaemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. Hepatology 1997;26:1123-30
51. Szostecki C, Guldner HH, Netter HJ, et al. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. J Immunol 1990;145:4338-47
52. Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, et al. Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. J Exp Med 1990;172:961-967
53. Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, et al. Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp 100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. Scand J Immunol 1995; 42:257-268
54. Wesierska-Gadek J, Hoheneuer H, et al. Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1996;110:840-847
55. Gordon S, Quattrociocchi T, Kodali V, et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholagiopathies Gastroenterology 1995;108:18092-1809
56. Nakanuma Y, Tsuneyama K, Gershwin ME, et al. Pathology and immunopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on bile duct lesions: recent progress. Semin Liver Dis 1995;15:313-328j.
57. Berg PA, Klein R, Rocken M. Cytokines in primary biliary cirrhosis. Semin Liver Dis 1997;17:61-69.
58. Harada K, Van de Water J, Leung PS. In situ nucleic acid hybridation of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. Hepatology 1997;25:791-796.
59. Yasoshima M, Nakanuma Y, Tsuneyama K, et al. Immunohistochemical analysis of adhesion molecules in the micro-environment of portal tracts in relation to aberrant expression of PDC-E2 and HLA-DR on the bile ducts in primary biliary cirrhosis. J Pathol 1995;175:319-325
60. Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, et al. HLA DRB4-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune disease. J Exp Med 1995;181:1835-1845
61. Shimoda S, Nakamura M, Shigematsu H. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. Hepatology 2000;31:1212-1216
62. Inoue K, Hirohara J, Nakano T. Prediction of prognosis of primary biliary cirrhosis in Japan. Liver 1995; 15: 70–77
63. Leuschner U. Primary biliary cirrhosis—presentation and diagnosis. Clin Liver Dis 2003; 7: 741–758.
64. Angulo P, Lindor K. Primary Biliary Cirrhosis.In Feldman: Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7th ed. 2002:1474-1485
65. Wolke AM, Schaffner F, Kapleman B. Malignancy in primary biliary cirrhosis: High incidence of breast cancer in affected women. Am J Med 1984;76:1075 -1084
66. Goudie BM, Burt AD, Boyle P. Breast cancer in women with primary biliary cirrhosis. BMJ 1985;291:1597- 1602
67. Loof L, Adami HO, Sparen P. Cancer risk in primary biliary cirrhosis: A population-based study from Sweden. Hepatology 1994;20:101-107
68. Nijhawan PK, Therneau TM, Dickson ER. Incidence of cancer in primary biliary cirrhosis: The Mayo experience. Hepatology 1999;29: 1396-1405
69. Pares A, Guañabens N, Alverez L, et al. High Osteoprotegerin and low RANKL levels in primary biliary cirrhosis. Relationship with the severity of liver disease but not with osteoporosis. Hepatology 2007;40 (4) suppl 1:463A

70. Arria AM, Tarter RE, Warty J, et al Vitamin E deficiency and psychomotor dysfunction in adults with primary biliary cirrhosis. Am J Clin Nutr 1990; 52: 383–90
71. Poupon RE, Chretien Y, Poupon R, et al. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy. Hepatology 1993; 17: 599–604
72. Walker JG, Doniach D, Roitt IM, et al. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet 1965; 1: 827–31
73. Angulo P, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Clin Liv Dis 1999; 3: 529–70
74. Bernstein RM, Callendar ME, Neuberger JM, et al. Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis. Ann Rheum Dis 1982; 41: 612–14
75. Goodman, ZD, McNally PR, Davis KR, et al. Autoimmune cholangitis: a variant of primary biliary cirrhosis—clinicopathologic and serologic correlations in 200 cases. Dig Dis Sci 1995; 40:1232–42
76. Kim WR, Poterucha JJ, Jorgensen RAI. Does antimitochondrial antibody status affect response to treatment in patients with primary biliary cirrhosis? Outcomes of ursodeoxycholic acid therapy and liver transplantation. Hepatology 1997; 26: 22–26
77. Lazaridis K, Angulo P, Keach. Lymphadenopathy in patients with cholestatic liver disease. Hepatology 2000;32:512A
78. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GSA. Staging of chronic non-suppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). Virchows Arch 1978;379:103-112
79. Springer J, Cauch-Dudek K, O'Rourke K, et al. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: a study of its natural history and prognosis. Am J Gastroenterol 1999;94:47-53
80. Pare A, Rode J. Natural history of primary biliary cirrhosis Clin Liver Dis 2003; 7; 779–794
81. Heathcote J, Ross A, Sherlock S. A prospective controlled trial of azathioprine in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1976;70: 656– 60
82. Christensen E, Neuberger J, Crowe J, et al. Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial. Gastroenterology 1985;890:1084 - 91
83. Matloff DS, Alpert E, Resnick RH, et al. A prospective trial of d-penicillamine in primary biliary cirrhosis. N Engl J Med 1982;306:319 - 26.
84. Kaplan MM, Alling DW, Zimmerman HJ, et al. A prospective trial of colchicine for primary biliary cirrhosis. N Engl J Med 1986;315:1448 - 54
85. Kaplan MM, Knox TA. Treatment of primary biliary cirrhosis with low-dose weekly methotrexate. Gastroenterology 1991;101:1332 – 1338.
86. Bergasa NV, Jones A, Kleiner DE, et al. Pilot study of low dose oral methotrexate treatment for primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol 1996;91;295– 299
87. Hendrickse MT, Rigney E, Giaffer MH, et al. Underwood JC, et al. Low-dose methotrexate is ineffective in primary biliary cirrhosis: long-term results of a placebo-controlled trial. Gastroenterology 1999;117: 400 –407
88. Mitchison HC, Bassendine MF, Malcom AJ, et al. A pilot, double-blind, controlled 1-year trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis: hepatic improvement but greater bone loss. Hepatology 1989;10:420– 429
89. Mitchison HC, Palmer JM, Bassendine MF, et al. A controlled trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis. Three-year results. J Hepatol 1992;15: 336– 344
90. Wiesner RH, Ludwig J, Lindor KD, et al. A controlled trial of cyclosporine in the treatment of primary biliary cirrhosis. N Engl J Med 1990;322: 1419– 1424
91. Lombard M, Portmann B, Neuberger J, et al. Cyclosporin A treatment in primary biliary cirrhosis: results of a long-term placebo controlled trial. Gastroenter-ology 1993;104:519 – 526
92. Lindor KD, Dickson ER, Baldus WP.Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1994;106:1284-1290
93. Angulo P, Dickson ER, Therneau TM. Comparison of three doses of ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis: A randomized trial. J Hepatol 1999; 30:830-838
94. Pares A, Caballeria L, Rodes J. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: Results of a double-blind controlled multicentric trial. J Hepatol 2000;32:561-567
95. Christensen E, Gunson B, Neuberger J. Optimal timing of liver transplantation for patients with primary biliary cirrhosis: use of prognostic modelling. J Hepatol 1999;30:285–292
96. Kim WR, Wiesner RH, Therneau TM. Optimal timing of liver transplantation for primary biliary cirrhosis. Hepatology 1998; 28: 33–38
97. 1999 annual report of the US Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: transplant data 1989–1998. Rockville, MD: HHS, HRSA, OSP, DOT, and UNOS, 2000

28

BASES MOLECULARES DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES DEL SISTEMA NERVIOSO

Luis Miguel Gómez
Juan-Manuel Anaya



Contenido

Esclerosis múltiple
- Historia
- Definición
- Inmunopatología
- Barrera hematoencefálica
- Células T autorreactivas
- Citoquinas
- Respuesta humoral
- Infección
- Células dendríticas
- Coestimulación
- Inmunogenética

Miastenia gravis
- Fisiopatología
- Características clínicas
- Inmunidad humoral
- Inmunidad celular
- Papel del timo
- Uso clínico del conocimiento básico de los AchRs

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central, que desencadena disfunción neurológica progresiva. Se caracteriza por infiltraciones perivasculares de células inflamatorias, placas de desmielinización, astrogliosis e injuria de los axones. Se cree que el factor clave en la fisiopatología de la enfermedad es el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que da paso a linfocitos T autorreactivos dirigidos contra la mielina y por lo tanto inician la reacción inflamatoria en el sistema nervioso. La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune causada por autoanticuerpos dirigidos contra los receptores acetilcolina nicotínicos de la membrana postsináptica en la unión neuromuscular, caracterizada por debilidad y fatiga muscular. En este capítulo se discuten algunos aspectos acerca de la fisiopatología de dos enfermedades autoinmunes neurológicas como son la esclerosis múltiple y la miastenia gravis, con implicaciones futuras en el área clínica.

Historia

La descripción de la enfermedad data desde el siglo XIV cuando se informa del caso de santa Ledwina de Schiedman, cuya enfermedad consistió en parálisis de una extremidad, disfagia, trastornos sensitivos y problemas visuales. Un neurólogo francés en el Salpetriere en París, llamado Jean Martín Charcot, fue el primero en describir la esclerosis múltiple (EM) en 1868, cuando observó una acumulación de células inflamatorias con distribución perivascular en el cerebro y en la sustancia blanca de pacientes con episodios intermitentes de disfunción neurológica (1). Este descubrimineto fue llamado originalmente en francés *sclérose en plaques disemineés* o esclerosis múltiple.

Posteriormente, Elvin Kabat en 1948, observó un incremento de las inmunoglobulinas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM, confirmando la naturaleza inflamatoria de esta enfermedad (2,3).

En la mitad del siglo pasado, varios estudios poblacionales en gemelos comprobaron el gran componente genético de la enfermedad (4-11). La demostración de autoinmunidad fue más reciente, al igual que la caracterización como enfermedad desmielinizante. Esta última se logró mediante la inmunización con mielina del sistema nervioso central (CNS) en el modelo murino de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), desarrollado por Thomas Rivers en 1933, con inyecciones repetidas del cerebro y médula espinal de conejos en primates (12). Estos hallazgos han confirmado la hipótesis de que la EM es un proceso secundario a una respuesta autoinmune a autoantígenos en un hospedero susceptible.

Definición

La EM es una enfermedad autoinmune humana y de etiopatología no clara. Es la enfermedad desmielinizante más común del SNC. La prevalencia en diferentes países del mundo ha sido clasificada como baja: 5 casos por 100.000 habitantes; media: 5-30 casos; alta: más de 30 casos por 100.000 habitantes, como en el caso de países de la latitud norte. La EM es más frecuente en mujeres que en hombres con una relación 2:1, respectivamente; está más en la raza blanca y su edad de aparición oscila entre los 20 a 40 años.

Inmunopatología

En el tejido del SNC de individuos con EM hay placas desmielinizantes en la sustancia blanca con una predilección por los nervios ópticos, regiones periventriculares, médula espinal y cerebro. Además, se observa injuria de los axones (13), células del sistema inmune como CD4+ y CD8+, entre otras (Tabla 1).

Barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE es una barrera de difusión, la cual impide la entrada de los componentes principales de la sangre hacia el cerebro. Ésta contiene tres elementos básicos que son células endoteliales, astrocitos y pericitos. Las células endoteliales de la BHE se diferencian de las demás células endoteliales por que no presentan fenestraciones y transportan vesículas por pinocitosis. La BHE bajo condiciones fisiológicas es impermeable, pero en condiciones patológicas varios mediadores bioquímicos e inmunológicos que son liberados aumentan su permeabilidad. Dentro de estos mediadores se pueden encontrar glutamato, aspartato, ATP, óxido nítrico (ON), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e IL-1β, los cuales son producidos por los astrocitos en su mayoría (14-17). Otros agentes humorales que también afectan la permeabilidad son las bradiquininas, serotoninas, histaminas, trombinas, factor activador de plaquetas (PAF), y radicales libres (15,18,19). La permeabilidad de la BHE es crucial en la patogénesis de la EM. Estudios que han empleado resonancia magnética (RM), detectan que el primer cambio en la formación de la lesión o extensión de lesiones viejas es la alteración de la permeabilidad de la BHE. Referente a este aspecto, la ruptura de la BHE es necesaria para la inducción de EAE (20). Los linfocitos T activados son claves en el mantenimiento de dicha barrera; se ha demostrado en linfocitos T de ratas activados con proteína básica de la mielina (MBP), y en presencia de anticuerpos contra la proteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) en el SNC, que presentan un aumento considerable en la desmielinización comparado con aquellas ratas con células T normales. En este mismo experimento se comprobó la salida de suero con contenido de células inflamatorias hacia el cerebro y un incremento en el transporte vesicular en las células del endotelio (21). El TNF es una citoquina importante en el

Tabla 1. Elementos identificados en placas de pacientes con EM.

Celulares	Moleculares
· Células T (CD4+, CD8+, TCR α/β y TCR γ/δ)	· Inmunoglobulinas (varios isotipos)
· Macrófagos, células B y células plasmáticas	· Componentes del complemento (incluyendo CAM)
· Células autorreactivas (microglia, astrocitos y células endoteliales)	· Citoquinas proinflamatorias (TNFα, IFNγ, IL-2, IL-12)
	· Quimioquinas
	· MMPs
	· Moléculas de adhesión (sobre el endotelio, leucocitos y células de la glia)

La diversidad en los elementos tanto celulares como moleculares encontrados en placas de pacientes con EM, da a entender que el daño tisular es producido por diferentes mecanismos patogénicos. CAM: complejo de ataque de membrana; MMPs: metaloproteinasas de matriz; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón; IL: interleuquina; TCR: receptor de célula T.

proceso de migración celular y formación de placas (22,23). Es así como algunos estudios indican que, bajo ciertas condiciones, la BHE puede ser destruida por células T activadas que no son producidas en el cerebro, por la síntesis de citoquinas proinflamatorias que dan lugar a regiones de desmielinización en forma de placas (Figura 1).

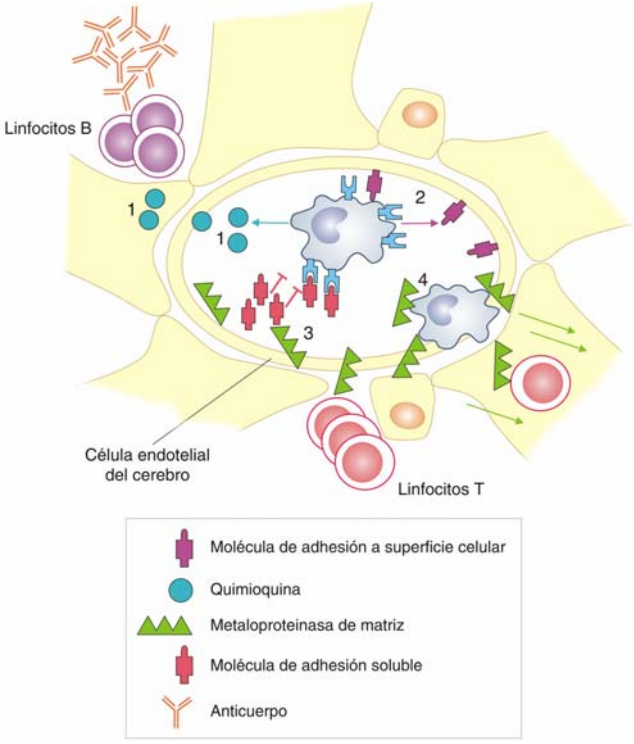


FIGURA 1.
Mecanismos involucrados en la permeabilidad de la BHE.
En lesiones activas de EM, las células endoteliales de la microcirculación del cerebro, expresan diferentes moléculas como citoquinas y quimioquinas (1), moléculas de adhesión de membrana (2) y solubles (3) metaloproteinasas de matriz (4), redundando en el aumento de la permeabilidad de la BHE.

Células T autorreactivas

Las células autorreactivas CD4+ contra la mielina se producen de manera fisiológica en el CNS y son detectadas en sangre periférica en igual número tanto en pacientes como en controles (24). Por lo tanto, la sola presencia de células T autorreactivas no son suficientes para desencadenar la enfermedad. Las células T autorreactivas periféricas atraviesan la BHE e inician la inflamación crónica del SNC, como se ha demostrado en la EAE (25). Es importante entender los factores que desencadenan la producción de células T autorreactivas contra la mielina y el grado de diferencia que poseen en la activación de repertorios diferentes de receptores de células T (TCRs) y en las diferentas vías de las moléculas de coseñalización (Capítulo 10) (Figura 2). En conclusión, la diferencia entre una persona sana y una con EM, a nivel de células T autorreactivas, es el nivel de permeabilidad de la BHE y no las células T autorreactivas como tal, ya que éstas, se producen de manera fisiológica y por lo tanto no explican la presencia de la enfermedad.

Se ha caracterizado varios tipos de células T autorreactivas en EM contra blancos como la MBP, MOG, glicoproteína asociada a la mielina, y la proteína proteolípidica (ésta se encuentra aumentada en pacientes con EM, tanto en periferia como en LCR)

Un estudio comprobó que la diferencia entre estas células autorreactivas de pacientes, comparadas con las de controles producían más IL-2 y por lo tanto potenciaban su acción en SNC (26).

En general, para la activación de los linfocitos T CD4+ se necesitan dos señales, una que depende de la interacción con el TCR y otra de la coestimulación. Dos trabajos recientes han demostrado que las células T autorreactivas periféricas contra la MBP son menos dependientes de la coestimulación que las de controles sanos (27,28). Otro estudio evidenció que las células T autorreactivas de pa-

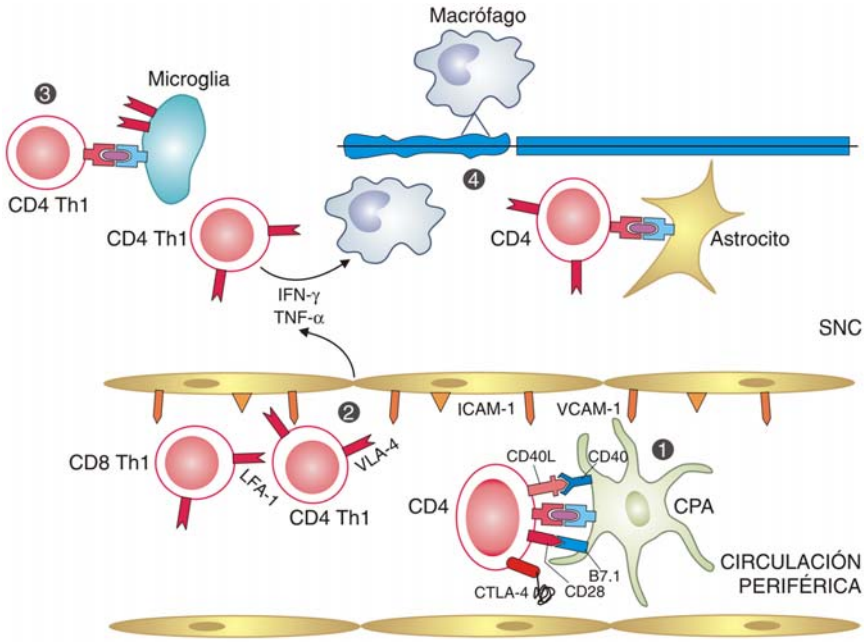


FIGURA 2.
Mecanismos principales que interactúan en la ruptura de la BHE y contribuyen a la inmunopatología de la EM.
1. Células T autorreactivas son activadas en la circulación; 2. las células T activadas se unen a moléculas de adhesión de células endoteliales y migran a través de la BHE en el SNC; 3. las células autorreactivas reconocen los componentes del cerebro, como la MBP, MOG, e inician la respuesta inflamatoria crónica y el daño tisular, que en este caso se traduce en una desmielinización; 4. la mielina es destruida por macrófagos, citoquinas, radicales libres del oxígeno y del nitrógeno, producto de la inflamación local.

cientes con EM tienen un estado potenciado de activación y necesitan menos de la coestimulación, sugiriendo una ruptura de la tolerancia periférica para los autoantígenos (29). Cuando la célula T autorreactiva contra la mielina es menos dependiente de la coestimulación para su activación, puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad, ya que en condiciones donde existe un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, el hospedero produce más moléculas inflamatorias y por lo tanto activa la BHE.

Citoquinas

Las células T CD4+ con un fenotipo tipo Th1 han sido patogénicas en EM, ya que los patrones de expresión de citoquinas de estas células, expresan diferentes tipos de receptores de quimioquinas. Lo anterior fue demostrado en placas de pacientes con EM donde los niveles de expresión de los receptores de quimioquinas eran más altos (30-32). Cuando se ha analizado el mRNA en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM, se ha encontrado preferencialmente, citoquinas tipo Th1 (33). En estudios de inmunohistoquímica de las placas de pacientes con EM se observa que hay un aumento de citoquinas como TNFα, e IL-12 en comparación con controles sanos y con otras enfermedades neurológicas. Por consiguiente, se cree que el daño tisular en pacientes con EM, es mediado, en parte, por el TNF-α (34-36).

Intervenciones terapéuticas que puedan cambiar o desviar el patrón de citoquinas de Th1 a Th2, pueden ser favorables, ya que este cambio puede disminuir el grado de daño tisular cerebral. Además, las citoquinas Th2 producidas localmente, evitarían la producción de más citoquinas Th1 por un mecanismo conocido como supresión por retroalimentación positiva.

Respuesta humoral

Se ha determinado la presencia de inmunoglobulinas intratecales desde el año 1940, cuando se reportó el aumento de inmunoglobulinas en LCR de pacientes con EM (37). Esta observación ha sido validada varias veces y se ha considerado como una herramienta importante dentro del diagnóstico de la enfermedad. El isotipo más común es la inmunoglobulina G (IgG) (38), y en menor proporción IgM (39), IgD (40) e IgA (41). En estudios de inmunohistoquímica de células B, se ha detectado sobre todo la presencia de IgG (42). Igs en LCR de pacientes con EM, separadas por la técnica de punto isoeléctrico, muestran diferentes patrones de bandas que no son observadas en controles sanos (43). Se cree que son bandas oligoclonales (BO) derivadas de inmunoglobulinas de una población de células B especial dentro del SNC. Las BOs se detectan en un 90% de los casos de EM (44-46).

La posibilidad de que existan Igs en LCR contra la MBP y otros componentes como MOG, MAG han sido examinados por varios investigadores con resultados controversiales, entre pacientes y fenotipos clínicos de la enfermedad.

Infección

Se han reportado varios agentes infecciosos asociados con EM, de manera serológica o patológica (47) pero ninguna de estas asociaciones es concluyente y tampoco han sido replicadas en otros laboratorios. Algunos agentes infecciosos causan enfermedades desmielinizantes en animales y en humanos. Se ha propuesto que la exposición a agentes infecciosos en individuos genéticamente susceptibles podría desencadenar EM, con ataques agudos, relacionados con la reactivación de la infección latente (48). Además, la exposición a agentes extraños, posiblemente que procedan de microorganismos y que se parezcan a componentes del hospedero (mimetismo molecular), pueden desencadenar autoinmunidad (Figura 3) (49,50).

El daño de tejido normal puede exponer nuevos antígenos al sistema inmune que le causen sensibilización y posteriormente se presenta una reacción mayor generalizada (generalización del epítope).

De los agentes infecciosos que han mostrado mayor relación con la EM, están el virus del Epstein-Barr (EBV), Herpes virus humano 6 (HHV-6) y *Chlamydia pneumoniae* (51). En un estudio, en el cual se midieron anticuerpos contra EBV se detectó seropositividad de la IgG en un 100% de los pacientes contra un 90% y un 4% de IgM en controles sanos, concluyéndose que la infección por EBV es importante para la EM, pero no es fundamental para el desarrollo de la enfermedad (52). Se ha encontrado DNA de HHV-6 en placas de pacientes con EM; además; se ha descrito altos niveles séricos de IgMs contra HHV-6 en estos pacientes (53). En otro estudio se realizaron cultivos para *Chlamydia pneumoniae* a partir de LCR de pacientes con EM y controles, con una positividad del 64% contra un 11%, respectivamente. También se halló una proteína específica de *Chlamydia pneumoniae* en el LCR y patrones de Igs específicas de este mismo patógeno en los pacientes con EM (54). Éstos estudios no se han podido replicar, por que no se puede llegar a discernir si estos microorganismos son patogénicos o son el resultado del daño en el SNC y consecuencia de la autoinmunidad.

Células dendríticas

La presencia de células dendríticas (DC) plasmocitoides y mieloides se han descrito en pacientes con EM, pero aún no se ha podido definir su origen (sangre periférica vs SNC) (55). Las DC mieloides son más diferenciadas en LCR y expresan mayores niveles de moléculas claves para la presentación antigénica como son HLA-DR, CD80, CD 86, y CD40, que las células aisladas de sangre periférica (Figura 4). No existen diferencias entre DC plasmocitoides del LCR y la sangre periférica. Ambas poblaciones de DC expresan significativamente quimioquinas como CCR5, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

Sin embargo, los niveles de MIP-1α son bajos comparados con RANTES e IP-10, en pacientes (56). De todas maneras, las DC producen y expresan quimioquinas y sus respectivos receptores, aunque no se conoce muy bien que importancia tienen en la fisiopatología de la enfermedad.

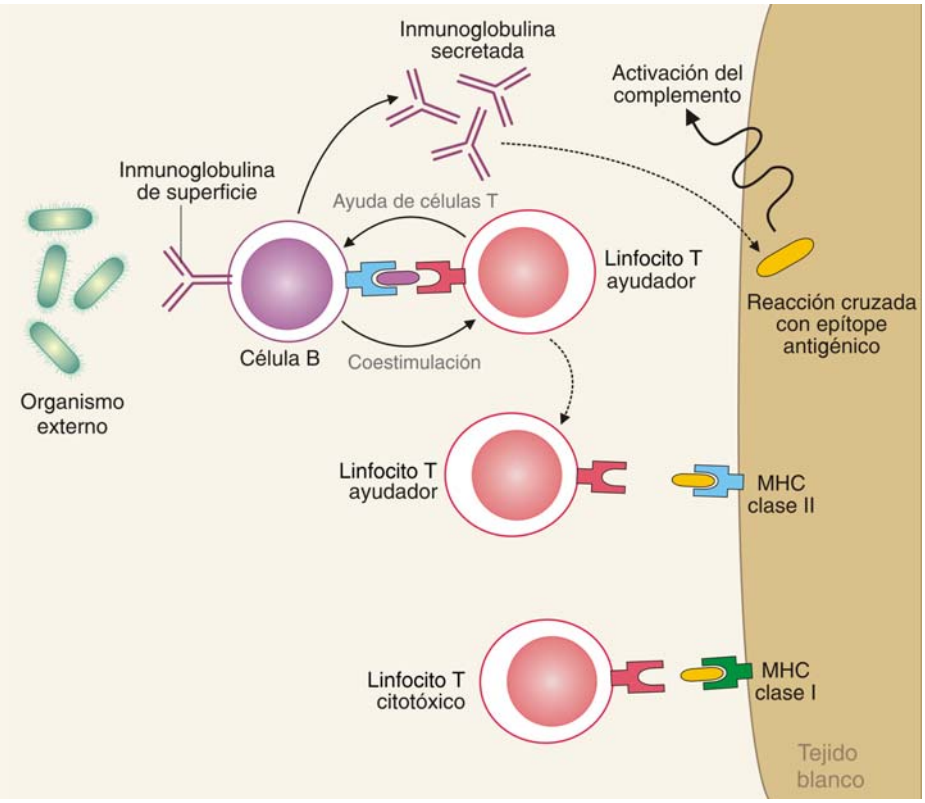


FIGURA 3.
Mimetismo molecular.
Si las moléculas reconocidas por el sistema inmune se parecen a componentes propios del hospedero se activan células T autorreactivas que perpetúan la inflamación.

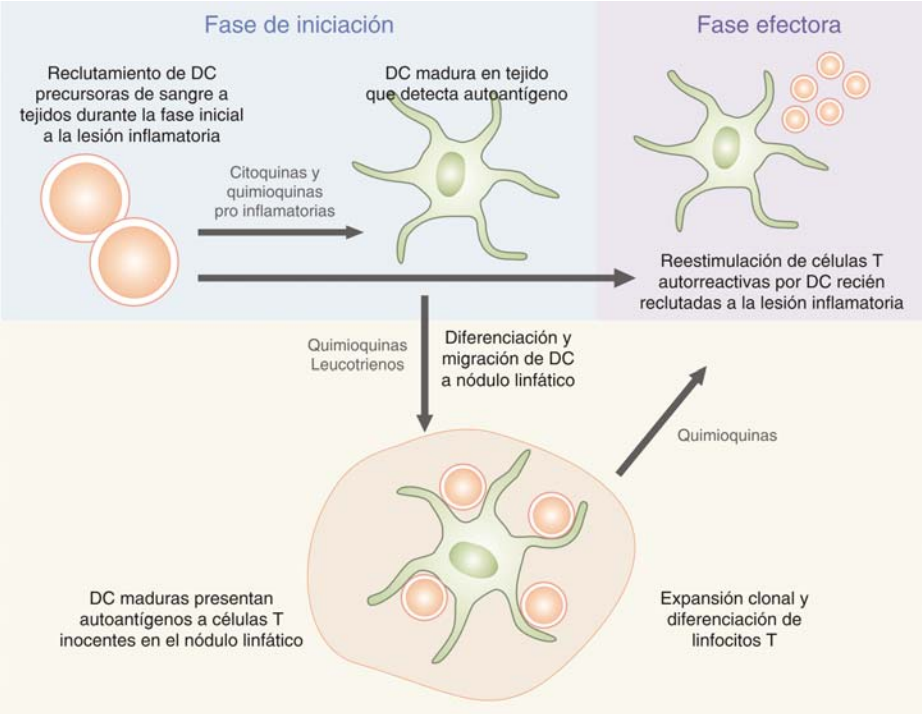

Fase de iniciación
Fase efectora
Reclutamiento de DC precursoras de sangre a tejidos durante la fase inicial a la lesión inflamatoria
DC madura en tejido que detecta autoantígeno
Citoquinas y quimioquinas pro inflamatorias
Reestimulación de células T autorreactivas por DC recién reclutadas a la lesión inflamatoria
Quimioquinas Leucotrienos
Diferenciación y migración de DC a nódulo linfático
Quimioquinas
DC maduras presentan autoantígenos a células T inocentes en el nódulo linfático
Expansión clonal y diferenciación de linfocitos T

FIGURA 4.
Mecanismos posibles de acción de las DC en EM.
Durante la primera fase, precursores de las DC circulantes, como monocitos, DC mieloides, y DC plasmocitoides, migran a los tejidos afectados (cerebro) en respuesta a citoquinas y quimioquinas producidas por el proceso de presentación de autoantígenos como MBP.

Coestimulación

Muestras de sangre periférica de pacientes con EM, han mostrado una expresión aumentada de moléculas B7.1 (CD80), en especial los pacientes con una enfermedad progresiva rápida, si se compara con controles sanos o enfermos que han tenido remisión de la enfermedad (57). En otro estudio la expresión de B7.1 estuvo aumentada durante las recaídas de la enfermedad y localizadas en las células B (58). El tratamiento de pacientes con IFN-β, redujo la expresión de B7.1 en células B y aumentó la expresión de B7.2 (CD86) en monocitos de pacientes con la forma de EM "recaída-remisión". En resumen el eje de la coestimulación demarcado por B7-CD28-CTLA-4 (entre la coestimulación y la coinhibición) puede jugar un papel importante y particularmente B7.1 posee una función clave (Figura 5).

El antígeno 4 asociado a los linfocitos (CTLA-4) se une a las moléculas B7 inhibiendo su función al impedir la unión con CD28. En estudios con la proteína de fusión CTLA-4Ig se ha demostrado que tiene la posibilidad de inhibir EAE cuando son transferidos a otros ratones (59). Esta posibilidad se debe a la producción de citoquinas tipo Th2 o Th3 (TGF-β e IL-10) o al papel clave de las células T reguladoras. CTLA-4Ig se puede unir a B7 en la superficie de DCs, influyendo sobre el catabolismo del triptófano, lo cual resulta en un control de la proliferación celular T (60). Así mismo, CTLA-4Ig parece ser una herramienta importante para la terapéutica, como se demostró en EAE y como se ha estado comprobando en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES).

Inmunogenética

La idea de que los factores genéticos pueden jugar un papel importante en EM, ha surgido desde 1980, con estudios de agregación familiar (61,62). La primera asociación genética fue reportada en 1972 con el HLA-I. Sin embargo, hoy en día no se comprende de una manera clara la contribución genética a la fisiopatología de la enfermedad. En la Tabla 2 se ilustra el riesgo familiar en EM.

En estudios de gemelos existe una mayor concordancia en gemelos monocigotos comparados con la concordancia entre dicigotos (Tabla 3). Sin embargo, varios gemelos monocigotos son discordantes, indicando que los factores no genéticos (ambientales) son claves en la etiología de la enfermedad.

En estudios de ligamiento se han identificado varios genes de susceptibilidad para EM en diferentes poblaciones como la canadiense (63), americana (64), Reino Unido (65), finlandesa (66), italiana (67), nórdica (68), australiana (69) y de Sardinia (70) (Tabla 4). Se han hecho búsquedas amplias del genoma en familias afectadas con marcadores tipo microsatélites. Sin embargo, cada estudio emplea diferentes marcadores microsatélites, el tamaño de la muestra y los niveles de significancia también varían, lo que dificulta un análisis global del comportamiento genético de la EM, por lo menos en estas pobla-

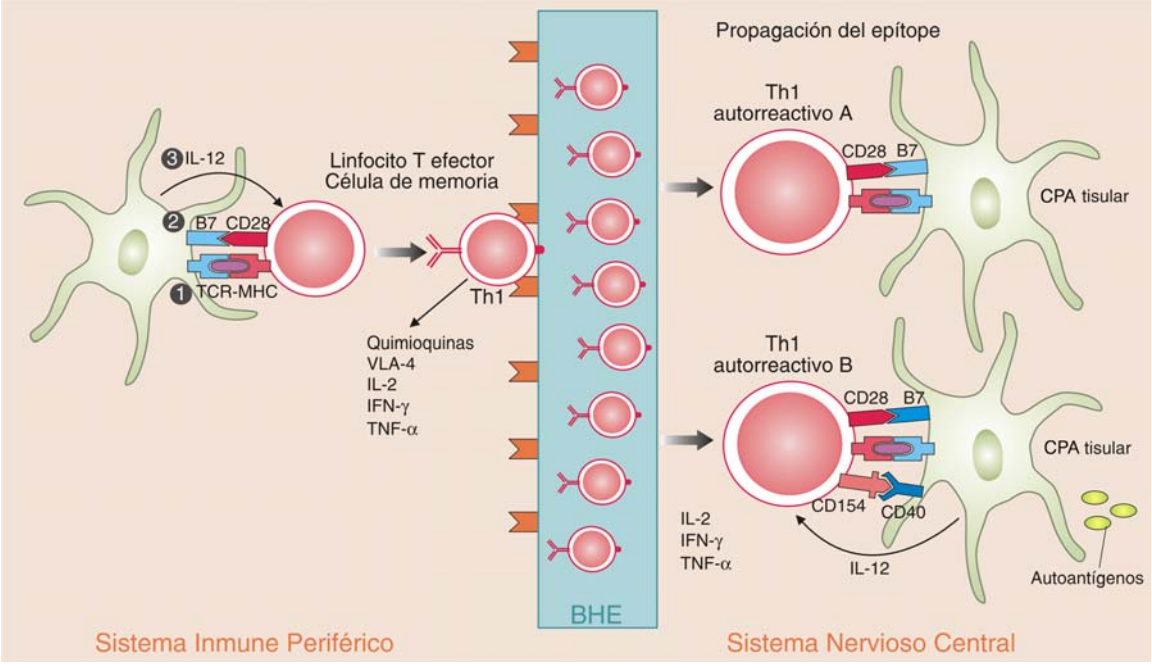


FIGURA 5.
Señales coestimuladoras y su propagación en EM.
La presentación de los autoantígenos a las células T en presencia de moléculas coestimuladoras, da lugar a la activación de células T autorreactivas. Éstas, a su vez, penetran la BHE e invaden el SNC. En el SNC son reactivadas por componentes de antígenos de la mielina por células presentadoras de antígenos (CPAs) locales como células de la microglia. El contexto inflamatorio induce a un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras adicionales, que facilitan la presentación del autoantígeno. La reactivación de la célula T provoca la producción de citoquinas como TNF-α, como también el reclutamiento de macrófagos en el SNC, lo que facilita el daño tisular. Posteriormente se liberan autoantígenos adicionales que activan más CPAs y que continúan el ciclo.

Tabla 2. Riesgo familar en EM.

Relación	Riesgo Relativo (%)	Tiempo de riesgo incrementado comparado con la población general	Identidad en la descendencia (%)
Familiares de primer grado	3-5	15-25	50
Gemelas monocigotas femeninas	34	170	100
Hermanos adoptados	0.2	1	0
Hijos de padres afectados	30.5	150	50 para cada padre

Tabla 3. Estudios genéticos en gemelos en EM.

Referencia	Concordancia entre gemelos homocigotos	Concordancia entre gemelos dicigotos
Thums	0/14	1/36 (2.8%)
Bammer, et al	1/6	2/7 (28.6%)
Mackay, et al	6/36 (16.7%)	3/26 (11.5%)
Gardner, et al	0/1	No dato
Bobowick, et al	2/5 (40%)	0/4
Williams, et al	6/12 (50%)	2/12 (16.7)
Currier, et al	8/22(36.4)	3/29 (10.3%)
Heltberg, et al	4/19 (21.1%)	1/28 (3.57%)
Kinnunen, et al	1/11 (9.1%)	0/10
Kinnunen, et al	2/7 (28.6%)	0/6
Grupo de investigación francesa	1/17 (5.9%)	1/37 (2.7%)
Mumford, et al	11/44 (25%)	2/6 (3.3%)
Willer, et al	24/133 (18%)	9/221 (4.1 %)
Total	62/308 (20.1%)	23/452 (5.1%)

ciones de origen caucásico. Haciendo un análisis global, los resultados muestran una evidencia fuerte del componente genético de algunos loci, como por ejemplo en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), en la región del MHC.

Miastenia gravis

Fisiopatología

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad autoinmune neuromuscular, que ha sido conocida desde 1672, cuando Thomas Willis describió el primer caso de una mujer con problemas articulares. La MG es causada por anticuerpos patogénicos contra los receptores acetilcolina nicotínicos (AchR) en la mayoría de los pacientes (Figura 6). Estos anticuerpos se unen a dominios extracelulares de la molécula nativa. Los anticuerpos en MG se cree que causan daño neuromuscular por tres mecanismos, primero los anticuerpos causan lisis dependiente de complemento en la membrana postsináptica (71-72); segundo, estos anticuerpos bivalentes hacen una reacción cruzada con los AchR, sobre la superficie de la membrana, lo cual lidera un incremento en la internalización y degradación de los AchRs (73); tercero, en algunos pacientes los anticuerpos inhiben la función de los AchRs directamente (74).

Características clínicas

Principalmente ocurre debilidad muscular y la fatiga de los músculos, en especial los músculos voluntarios. Los síntomas varían día a día e inclusive, de hora a hora, incrementándose en las tardes. Los factores que aumentan la debilidad muscular son esfuerzos, temperaturas altas, infecciones, trastornos emocionales, algunos medicamentos (como fenitoína, aminoglicósidos y anestésicos locales), cirugía y embarazo. Se puede presentar a cualquier edad, con un pico bimodal importante, siendo el primero en la tercera década y el segundo en la séptima década de la vida (mujeres jóvenes y hombres viejos). La debilidad de los músculos oculares es un síntoma inicial común, aunque sólo se presenta en el 10% de los pacientes. La ptosis y diplopia se exacerba cuando a los pacientes los ponen a

Tabla 4. Ligamiento genético positivo, en ocho búsquedas amplias del genoma en EM.

Cromosoma	Región (población)
1	p35 (C) p21 (RU) q11-24 (N), q42-44 (I,A)
2	p23 (Am), p21 (C), p13 (A), q24-23 (F,N,C), 2q36
3	p26 (N), p25 (C), p14 (C), q21-24 (Am,C,N,A,F), 3q26 (C)
4	p16 (C), q12 (N,F), q24 (A), q26-28 (A,C) q31-35 (A,Am)
5	P14-tel (C), p14-12 (F), q11-13 (A, RU), q13-23 (Am,C), q33 (I)
6	p25 (NI), p21 (N,F,Am), q14 (C), q21(N), q22 (I), q26 (A), q27(A)
7	p21 (C), p15 (RU), p14 (C), q11 (Am), q21-22 (Am,C), q32-35 (A,Am)
8	8p23-21 (A)
9	q21 (A), p24-22 (Am), q34 (N,Am)
10	p15 (N), p12-13 (N), cen (I), q21-22 (Am,F), q24 (S), q26 (C)
11	P15 (N,S,Am), q25 (F), q22 (C)
12	p13 (RU), q21 (N), q23 (Am), q24 (Am)
13	q31-32 (A), q33-34 (Am)
14	q32 (C)
15	q21(C)
16	p13 (N,A,Am), p11 (A), q23-24 (A), q12 (C)
17	p13 (A), q22-24 (F,RU), q25 (N)
18	P11 (A,F,C,Am), q21 (C)
19	q13 (F,Am,C)
20	p12 (A)
22	q12-13 (N,RU)
X	p21 (A,C), p11 (A,C), p22 (N,C), q23-28 (A), q26 (C)

S: sardinos; A: australianos; N: nórdicos; I: italianos; C: canadienses; Am: americano/francés; RU: Reino Unido; F: finlandeses. Se escogieron por un MLS (multiple lod score mayor a 1.8).

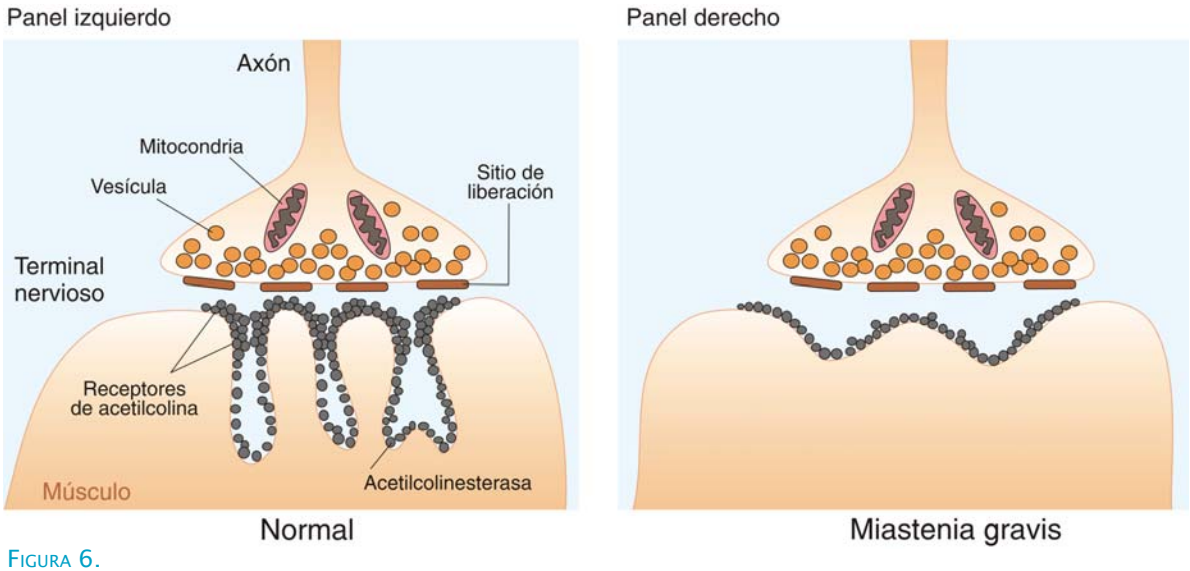


FIGURA 6.
Comparación entre las uniones neuromusculares normales y en pacientes con MG.
En el panel izquierdo se observa la unión neuromuscular normal. Su función principal es amplificar el impulso nervioso para poder desencadenar la contracción muscular. Existen tres componentes importantes de la unión neuromuscular: presináptico, sináptico y postsináptico. En el panel derecho se observa la unión neuro-muscular en miastenia gravis. Nótese que los bolsillos sinápticos están ensanchados, el número de AchRs está disminuido y la membrana postsináptica se vuelve más simple.

mirar hacia arriba en un punto fijo. Puede haber falla respiratoria y en ocasiones se debe recurrir a ventilación mecánica. Los síntomas pueden fluctuar entre períodos de recaídas y períodos largos de remisión.

Inmunidad humoral

Se han encontrado isotipos IgGs policlonales, especialmente IgG 1 y 3, que reaccionan con diferentes epítopes de superficie de los AchRs (72). Estas inmunoglobulinas de pacientes con MG se unen a las subunidades α del receptor, que se conoce como la región inmunogénica (72-73). La subunidad α también es el sitio de unión de la acetilcolina (Figura 7). Estos anticuerpos realizan una reacción cruzada contra los AchR y desencadenan la endocitosis y degradación de los AchRs por células musculares. Bloqueo por anticuerpos de los sitios de los sitios de unión de AchRs y destrucción mediada por complemento de la membrana postsináptica.

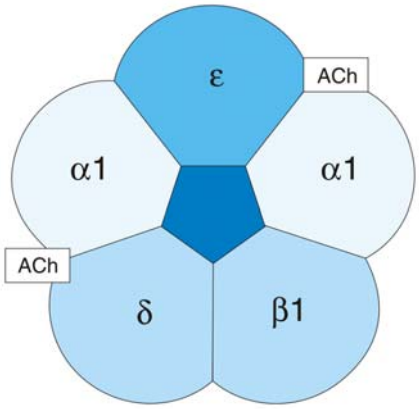


FIGURA 7.
Esquema sobre el receptor de acetilcolina.

Inmunidad celular

Las células T de pacientes con MG, responden a varios antígenos sintéticos de AchRs, reacción que también se observa en controles. La mayoría de las respuestas mencionadas antes son mediadas por las moléculas MHC clase II (75,76). Sin embargo, estas células T responden a pequeñas cantidades de AchR puro, al igual que la cantidad que se encuentra *in vivo*, por lo tanto, las respuestas pueden ser más relevantes en este proceso.

La miastenia gravis autoinmune experimental (EA MG), un modelo experimental de MG en ratones, demostró que la enfermedad podía ser transmitida con el suero de animales enfermos a otros sanos, identificando que esta patología era por transferencia de anticuerpos, más que por inmunidad celular. Sin embargo, lo anterior no es suficiente para determinar que la MG es una enfermedad autoinmune, por lo tanto en experimentos anteriores, se determinó que los anticuerpos eran específicos contra AchRs y que estaban en un 85% de los pacientes (77).

Papel del timo

La asociación de MG y timomas ha sido descrita desde hace 200 años. Anormalidades tímicas son encontradas en el 75% de los pacientes. De estas un 85% tienen hiperplasia germinal y un 15% tumores tímicos. Anticuerpos contra músculo estríado se encuentran en un 90% de los pacientes. En el timo se encuentran células similares a las células musculares que expresan AchRs. Estas células son rodeadas por linfocitos T y células presentadoras de antígenos. Se ha propuesto que dichas células son fuente de autoantígenos como el AchR. Cualquier alteración (por ejemplo virus o factores genéticos) puede romper la tolerancia y desencadenar autoinmunidad. Otras teorías pro-

ponen que la MG puede venir por un proceso de mimetismo molecular con microorganismos con estructuras similares a los AchR.

Uso clínico del conocimiento básico de los AchRs

La estructura molecular delos AchRs ha sido estudiada muy a fondo con fines diagnósticos y terapéuticos. En un estudio se mostró una mejor sensibilidad diagnóstica midiendo anticuerpos contra la subunidad ε de AchR, comparado con los anticuerpos medidos de rutina contra AchR (78). Fragmentos tipo Fab de anticuerpos monoclonales contra regiones inmunogénicas de AchRhan mostrado ser efectivos en la prevención de la EAMG (79). La fotoféresis de linfocitos periféricos expuestos a luz ultravioleta mostró más porcentaje de remisiones que aquellos pacientes con fotoféresis tradicionales (80). El micofenolato mofetil, es un potente inmunosupersor que fue inicialmente desarrollado para tolerancia a trasplantes sólidos. En un estudio en pacientes con MG se evidenció una notable mejoría de los pacientes que recibieron dicho medicamento comparado con un placebo (81). Estudios a través de tomografía computarizada han mostrado la eficacia del micofenolato en el tratamiento de MG frente a otros agente inmunosupresores (82).

Referencias

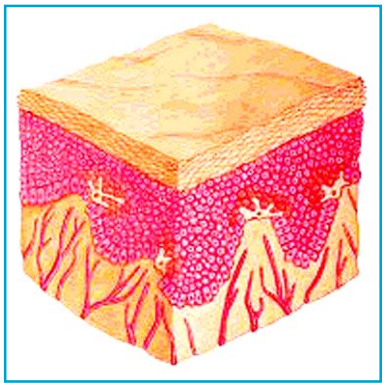
1. Charcot J. Lectures on the diseases of the nervous system. The new sydenham society 1877. London united kingdom 157-222
2. Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin ad gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. Am J Med 1948; 4:653-62
3. Kabat EA, Freedman DA, Murray JP, et al. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100 cases of multiple sclerosis and in other diseases. Am J Med Sci 1950; 219:55-64
4. Mackay RP, Myrianthopoulos NC. Multiple sclerosis in twins and their relatives. Arch Neurol 1966; 15:449-62
5. Williams A, Eldridge R, McFarland H, et al. Multiple sclerosis in twins. Neurology 1980; 30:1139-47
6. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. N Engl J Med 1986; 1638-42
7. Heltberg A, Holm N. Concordance in twins and recurrence in sibships in MS. Lancet 1982; 1:1068
8. Kinnunen E, Koskenvuo M, Kaprio J, et al. Multiple sclerosis in a nationwide series of twins. Neurology 1987; 37:1627-9
9. Utz U, Biddison WE, McFarland HF, et al. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. Nature 1993;364:243-7
10. Mumford C. The UK study of MS in twins. J Neurol 1992; 239:62
11. French Research Group on Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. Ann Neurol 1992; 32:724-7
12. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. J Exp Med 1933; 58:39-53
13. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 1998; 338:278-85
14. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. Cell Mol Neurobiol 2000; 20:131-47
15. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. J Anat 2002; 200:629-38
16. Chen Y, McCarron RM, Azzam N, et al. Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebromicrovascular endothelial responses and signal transduction. Acta Neurochir Suppl. 2000; 76:131-5
17. Kustova Y, Grinberg A, Basile AS. Increased blood-brain barrier permeability in LP-BM5 infected mice is mediated by neuroexcitatory mechanisms. Brain Res 1999; 839:153-63
18. Annunziata P, Cioni C, Toneatto S, et al. HIV-1 gp120 increases the permeability of rat brain endothelium cultures by a mechanism involving substance P. AIDS 1998; 12:2377-85
19. Pan W, Kastin AJ, Gera L, et al. Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. Neurosci Lett 2001; 307:25-8
20. Miller DH, Rudge P, Johnson G, et al. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. Brain 1988; 111: 927-39
21. Linington C, Bradl M, Lassmann H, et al. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. Am J Pathol 1988; 130:443-54
22. Westland KW, Pollard JD, Sander S, et al. Activated non-neural specific T cells open the blood-brain barrier to circulating antibodies. Brain 1999; 122:1283-91
23. Kojima K, Berger T, Lassmann H, et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. J Exp Med 1994; 180:817-29
24. Markovic-Plese S, Fukaura H, Zhang J, et al. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. J Immunol 1995; 155:982-92
25. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. J Neurosci Res 1991; 28:254-60
26. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. J Exp Med 1994; 179:973-84
27. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, et al. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. J Immunol 1998; 160:1532-8
28. Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. J Clin Invest 1998; 101:725-30
29. Burns J, Bartholomew B, Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. Ann Neurol 1999; 45:33-9
30. Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. J Immunol 1998; 160:550-4
31. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, et al. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:6873-8
32. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. J Clin Invest 1999; 103:807-815
33. Gallo P, Piccinno MG, Tavolato B, et al. A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN-gamma in multiple sclerosis CSF and serum. J Neurol Sci 1999; 101:227-32
34. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. J Exp Med 1995; 182:1985-96
35. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, et al. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. J Exp Med 1989; 170:607-612
36. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, et al. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. J Clin Invest 1991; 87:949-954
37. Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. Am J Med 4:653-62
38. Tourtellote WW. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In hand book of clinical neurology Amsterdan/New York, Elsevier Science, 1985; 79-130
39. Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. Brain 1991; 114:181-95
40. Sharief MK, Hentges R. Importance of intrathecal synthesis of IgD in multiple sclerosis. A combined clinical, immunologic, and magnetic resonance imaging study. Arch Neurol 1999; 48:1076-9
41. Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, et al. Immunoglobulin G, A, and M—clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and

serum—analysis by two-dimensional electrophoresis. Clin Immunol Immunopathol 1985; 35:313-27
42. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. Lab Invest 1978; 38:409-21
43. Lowenthal A, Van Sande M, Karcher D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF gamma-globulins. J New Drugs 1960; 6:51-6
44. Thompson EJ, Kaufmann P, Shortman RC, et al. Oligoclonal immunoglobulins and plasma cells in spinal fluid of patients with multiple sclerosis. Br Med J 1979; 1:16-7
45. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57:897-902
46. Kostulas VK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Methodological and clinical aspects. Acta Neurol Scand 1985; Suppl 103:1-112
47. Dalgleish AG. Viruses and multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1997; Suppl 169:8-15
48. Rivera-Quinones C, McGavern D, Schmelzer JD, et al. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. Nat Med 1998; 4:187-93
49. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. N Engl J Med 1999; 341:2068-74
50. Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. Annu Rev Med 2002; 53:285-302
51. Hunter SF, Hafler DA. Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS?. Neurology 2000; 55:164-5
52. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. Neurology 2000; 55:178-84
53. Soldan SS, Berti R, Salem N, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. Nat Med 1997; 3:1394-7
54. Boman J, Roblin PM, Sundstrom P, et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in the central nervous system of patients with MS. Neurology 2000; 54:265
55. Lucchinetti CF, Brueck W, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. Semin Neurol 1998; 18:337-49
56. Lucchinetti CF, Bruck W, Lassmann H. Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. Ann Neurol 2004; 56:308
57. Mena E, Rohowsky-Kochan C. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1999; 100:92-6
58. Genc K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. J Clin Invest. 1997; 99:2664-71
59. Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, et al. Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. J Immunol 1996; 157:3700-5
60. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol 2002; 3:1097-101
61. Eichorst H. Veber infantile and hereditary multiple sclerosis. Arch Pathol Anat Physiol Clin Med 1896; 146:173-92
62. Mackay RP. The familial occurrence of multiple sclerosis and its implications. Ann Intern Med 1950; 33:298-320
63. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, et al. A full genome search in multiple sclerosis. Nat Genet 1996; 13:472-6
64. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatability complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. Nat Genet 1996; 13:469-71
65. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. Nat Genet 1996; 13:464-8
66. Kuokkanen S, Sundvall M, Terwilliger JD, et al. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. Nat Genet 1996; 13:477-80
67. Broadley S, Sawcer S, D'Alfonso S, et al. A genome screen for multiple sclerosis in Italian families. Genes Immun 2001; 2:205-10
68. Coraddu F, Sawcer S, D'Alfonso S, et al. A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. Eur J Hum Genet 2001; 9:621-6
69. Ban M, Stewart GJ, Bennetts BH, et al. A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. Genes Immun 2002; 3:464-9
70. Akesson E, Oturai A, Berg J, et al. A genome-wide screen for linkage in Nordic sib-pairs with multiple sclerosis. Genes Immun 2002; 3:279-85
71. Engel AG. Myasthenia gravis and myasthenic syndromes. Ann Neurol 1984; 16:519-34
72. Engel AG, Arahata K. The membrane attack complex of complement at the endplate in myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci 1987; 505:326-32
73. Drachman DB, Angus CW, Adams RN, et al. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. N Engl J Med 1978; 298:1116-22
74. Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, et al. Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis. N Engl J Med 1982; 307:769-75
75. Kirchner T, Schalke B, Melms A, et al. Immunohistological patterns of non-neoplastic changes in the thymus in Myasthenia gravis. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1986; 52:237-57
76. Scadding GK, Vincent A, Newsom-Davis J, et al. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology. Neurology 1981; 31:935-43
77. Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, et al. Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. N Engl J Med 1977; 296:125-31
78. Ohta K, Fujinami A, Saida T, et al. Frequency of anti-AChR epsilon subunit-specific antibodies in MG. Autoimmunity 2003; 36:151-4
79. Papanastasiou D, Poulas K, Kokla A, et al. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by Fab fragments of monoclonal antibodies directed against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. J Neuroimmunol 2000; 104:124-32
80. Neretin VIa, Kil'diushevskii AV, Agafonov BV, et al. Photopheresis—anew method for treatment of myasthenia. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 2003; 103:11-4
81. Meriggioli MN, Rowin J, Richman JG, et al. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: a double-blind, placebo-controlled pilot study. Ann N Y Acad Sci 2003; 998:494-9
82. Wang P, Zuo C, Tian J, et al. CT-guided percutaneous ethanol injection of the thymus for treatment of myasthenia gravis. AJR Am J Roentgenol 2003; 181:721-4

29

ENFERMEDADES AUTOINMUNES DE LA PIEL

Rafael Herrera
Esperanza Ávalos



Contenido

Generalidades
Anatomía y fisiología cutánea
Autoinmunidad y piel
Lupus
Esclerodermia
Dermatomiositis
Vasculitis
Pénfigo
Penfigoide
Dermatitis herpetiforme

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, separa en forma natural el ambiente externo del interno; sin embargo, algunos factores físicos, químicos o biológicos pueden comprometer esta barrera. La piel puede ser afectada por una respuesta autoinmune local o ser el órgano blanco de manifestaciones dermatológicas de enfermedades sistémicas. Diversas enfermedades causadas por anticuerpos órgano-específicos pueden afectarla, tal como sucede en las enfermedades autoinmunes ampollosas y enfermedades asociadas a autoanticuerpos órgano-no-específicos como el lupus y las vasculitis. Otras son producto de mecanismos de hipersensibilidad celular como la dermatomiositis. Algunas son muy complejas y muestran producción exagerada de colágena y trastornos profundos en la regulación de la microvasculatura, como ocurre en la esclerodermia. En este capítulo se revisan las enfermedades cutáneas autoinmunes más frecuentes.

Generalidades

El sistema inmune permite al organismo *discriminar entre lo propio y lo extraño* y reaccionar contra lo no propio. La respuesta inmune es *inducible*, tiene *memoria*; es *específica*, y posee la habilidad de reconocer un número prácticamente ilimitado de antígenos debido a que es *diversa*. Esta propiedad es originada por el rearreglo de los genes de las inmunoglobulinas y de los genes del receptor de los linfocitos T (TCR). Otro mecanismo de diversidad son las mutaciones somáticas de ambos genes. Existen mecanismos constitutivos de resistencia conservados que se les conoce como *inmunidad innata*, donde intervienen fagocitos y células NK. Entre las moléculas responsables de la inmunidad innata se destacan las proteínas del *complemento*, los *péptidos antimicrobianos* como las defensinas, BPI, *colectinas*, el surfactante pulmonar y la proteína de unión de manosa (MBP).

El concepto de inmunidad innata fue propuesto por Janeway (1,2), y tiene como base el reconocimiento de antígenos de agentes infecciosos, antígenos llamados patrones-moleculares-asociados a patógenos (PAMPs), los que inducen una respuesta inmune. El descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLR, del inglés Toll like receptors), demostró la existencia de estos patrones de reconocimiento; los TLR se expresan en células dendríticas y contribuyen a la maduración funcional para la respuesta inmune adquirida (3). Las deficiencias de complemento parecen influir en la pérdida de la tolerancia y el desarrollo de autoinmunidad (4,5).

La inmunidad innata participa con mecanismos efectores, y se ha propuesto que activa receptores de "vigilancia" en sitios específicos de degradación de moléculas endógenas. Basados en este modelo, resulta sencillo explicar una respuesta inflamatoria inicial a un estímulo nocivo, con el desarrollo posterior de inmunidad adquirida. Los mecanismos innatos parecen ser primigenios en el desarrollo de autoinmunidad (6).

La inmunidad adquirida aparece semanas después de la exposición a un antígeno e induce la *memoria* inmunológica. Los linfocitos antígeno-específicos son los responsables de la inmunidad adquirida, y requieren de la recepción adecuada del antígeno, así como de señales coestimulatorias para poder proliferar y diferenciarse en una clona de células efectoras con especificidad al mismo antígeno (selección clonal). Los linfocitos B se transforman en células plasmáticas que sintetizan y secretan anticuerpos, los cuales se unen a patógenos extracelulares, y los opsonizan o los recubren para facilitar su fagocitosis. Por otro lado, los linfocitos T, que responden a patógenos intracelulares como los virus o a otros antígenos, se transforman en células citotóxicas CD8 (Tc) con capacidad de destruir células infectadas. Por su parte, los linfocitos CD4 o cooperadores (Th) estimulan la inmunidad celular (Th1) o la síntesis de anticuerpos (Th2) a través de la producción de citoquinas. Estas moléculas intervienen en la diferenciación celular para producir células de memoria, que tienen vida larga y rápida capacidad de respuesta cuando son reexpuestas a un antígeno. La inmunidad adquirida se consigue activamente por infección natural o por vacunación. La inmunidad puede ser transferida por el suero y es llamada inmunidad humoral, en tanto que aquella transferida por células T es llamada inmunidad celular.

La tolerancia central es un mecanismo que evita la autoinmunidad, se mantiene por el proceso de selección negativa en el timo y es auxiliado por los mecanismos de tolerancia periférica. La tolerancia central se origina durante la ontogenia y la tolerancia periférica que se desarrolla después del nacimiento. Se ha postulado que "*una falla en la tolerancia central siembra la semilla de la autoinmunidad y que la falla en los mecanismos de tolerancia periférica permite que la semilla germine*" (7). A nivel experimental se ha demostrado que la interferencia parcial en la selección positiva puede producir células T autorreactivas en ratones adultos (8), pero otros modelos murinos propensos a desarrollar lupus no exhiben defectos para la inducción de la deleción intratímica de timocitos inmaduros doble positivos después de la exposición al antígeno, como tampoco muestran diferencias en la disminución de la regulación de TCRs, ni exhiben diferencias en el número de timocitos apoptóticos al compararlos con ratones no autoinmunes (9).

Durante la maduración intratímica, la muerte celular programada de linfocitos T constituye un mecanismo importante para mantener la tolerancia central. En el timo los linfocitos autorreactivos son eliminados por apoptosis durante el proceso de selección negativa. El receptor Fas es importante en este proceso y los defectos en la vía de Fas producen autoinmunidad en ratones MRL-lpr, los animales MRL-lpr/lpr, CBA-lpr^{cg}/lpr^{cg} o C3H/HeJ-gld desarrollan una enfermedad linfoproliferativa generalizada, acompañada de deficiencia funcional de Fas, autoinmunidad, linfoadenopatía y anticuerpos antinucleares. Estos modelos demuestran que la falta de apoptosis en linfocitos autorreactivos mediada por Fas, produce autoinmunidad. También el gen supresor de tumores PTEN (tensin-fosfatasa) es relevante en las señales de transducción de Fas. Los mutantes heterocigotos *Pten*$^{+/-}$ son determinantes para el desarrollo de autoinmunidad y cáncer en ratones. Si bien esta falla no es clara en seres humanos, se han descrito, de manera extraordinaria, algunas familias con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) con mutaciones para Fas o FasL (1/218 pacientes), o pacientes con LES y defectos en la cascada de Fas que manifiestan clínicamente linfadenopatía, esplenomegalia y un síndrome autoinmune linfoproliferativo o ALPS o de Canale-Smith (10,11).

Con la descripción de las subpoblaciones de células Th1 y Th2, el concepto de enfermedades autoinmunes de la piel mediadas por Th, se han asociado a la producción de citoquinas Th1 como el IFNγ e IL-2; en tanto que la respuesta Th2, se le ha asociado a enfermedades alérgicas (12); por lo que el concepto de autoinmunidad regulada a través de citoquinas ha permitido el uso de agentes biológicos para tratar enfermedades autoinmunes de la piel, tales como los agentes bloqueadores del factor de necrosis

tumoral (TNF). Los aspectos puntuales de las generalidades mencionadas pueden ser ampliados en los capítulos de la primera sección de este libro.

Anatomía y fisiología cutánea

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, su peso corresponde aproximadamente al 16% del peso corporal, separa en forma natural el ambiente externo del interno; sin embargo, algunos factores físicos, químicos o biológicos pueden comprometer esta barrera, pudiendo ser afectada bien sea por una respuesta autoinmune local o ser el órgano blanco de manifestaciones dermatológicas de enfermedades sistémicas. La piel permite la comunicación con el exterior, pero posee moléculas protectoras, como por ejemplo la melanina producida por los melanocitos. La piel contribuye a la regulación de la temperatura corporal mediante las glándulas sudoríparas y ayuda a regular el metabolismo.

La piel está formada por dos capas, la más externa es llamada epidermis, formada por el estrato córneo o capa exterior, compuesta de células epiteliales queratinizadas y aplanadas, al que sigue el estrato lúcido. Hacia abajo existen tres capas de células poligonales suprabasales: la capa de células espinosas, llamada así por la apariencia de los desmosomas, también rica en filamentos de queratina. La capa basal es la más profunda y está formada por una línea de células que se dividen activamente para renovar cada 15 a 30 días las capas superiores de la epidermis. La parte inferior de la piel sobre la que descansa la epidermis es llamada dermis y está compuesta por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, folículos pilosos y glándulas sudoríparas y sebáceas. Los queratinocitos son las células fundamentales de la epidermis, responsables de producir queratina, proteína que da rigidez a la piel. Los fibroblastos son células abundantes en la dermis que proceden del mesénquima y producen colágena y elastina. Los melanocitos son formados durante el desarrollo embrionario a partir de la cresta neural, son abundantes en la epidermis, producen la melanina que es transferida al pelo o a la epidermis, y proporciona el color de la piel, además protege al DNA de la irradiación ultravioleta (UV). Las células de Langerhans (LC) tienen forma estrellada, son células profesionales presentadoras de antígenos (APC). Este linaje, que deriva de la médula ósea, es crítico para la inducción de la respuesta inmune primaria de la piel. Las LC capturan y procesan los antígenos y los presentan a los linfocitos T, y por lo tanto son importantes en las enfermedades autoinmunes de la piel. Estas células están localizadas en la epidermis y expresan la proteína Langerina, en la dermis corresponden a las células dendríticas dérmicas (DDC). Ambas expresan beta integrina CD11c y moléculas clase II (MHC). Las DDC carecen de CD1a E-cadherina, ausencia de gránulos de Birbeck y CD1b y CD1c (13,14). Se ha demostrado que las DC constituyen un puente entre la inmunidad innata y adquirida (15). Para finalizar, las células de Merkel son escasas y constituyen receptores sensoriales que responden a estímulos propioceptivos.

Autoinmunidad y piel

El *horror autotoxicus* descrito por Erlich o miedo a la autointoxicación, infería que algunas substancias autólogas (autoantígenos), eran capaces de despertar una respuesta, a través de un mecanismo que conocemos como autoinmunidad (16). Para el desarrollo de autoinmunidad es necesario que los mecanismos de tolerancia central o periférica fallen. La pérdida de la tolerancia ocurre en individuos genéticamente predispuestos; en efecto, tal como se revisa en detalle en los Capítulos 18 y 19, existe evidencia de asociación de genes del MHC con enfermedades autoinmunes (17).

En la piel existen diversas enfermedades causadas por anticuerpos órgano-específicos como es el caso de las enfermedades autoinmunes ampollosas, y enfermedades asociadas a autoanticuerpos órgano-no-específicos como el lupus y las vasculitis. Otras son producto de mecanismos de hipersensibilidad celular como la dermatomiositis. Algunas son muy complejas y muestran producción exagerada de colágena y trastornos profundos en la regulación de la microvasculatura, como es el caso de la esclerodermia. En este capítulo se revisan algunas de las enfermedades cutáneas autoinmunes más frecuentes.

Lupus

El LES es una enfermedad autoinmune crónica, con manifestaciones multisistémicas. La participación cutánea ocurre en la mayoría de los casos. Las manifestaciones comunes son eritema facial, fotosensibilidad, vasculitis, eritema nodoso, alopecia y lesiones de lupus discoide; y se presentan en un 50-85 % de los casos (18,19). No obstante, no todas las lesiones de "lupus" corresponden a LES, pues el término lupus puede no necesariamente implicar compromiso sistémico.

Desde el punto de vista dermatológico existen tres tipos de Lupus: el lupus eritematoso cutáneo crónico, el lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCLE), y el lupus eritematoso cutáneo agudo (Tabla 1). Ésta última presentación es la que más se asocia con la enfermedad sistémica. El segundo tipo corresponde a una dermatosis no cicatricial con fotosensibilidad, también asociada al LES pero en un porcentaje menor, como se describe a continuación.

Lupus cutáneo crónico

Llamado también lupus eritematoso discoide, se manifiesta entre los 20-40 años, es más frecuente en las mujeres que en los hombres, en una proporción 2:1. Generalmente se caracteriza por lesiones eritematosas, cicatriciales y atróficas, en forma de placas policíclicas anulares, de aquí el nombre. Su evolución crónica, y por lo regular, no se asocia al compromiso sistémico; sin embargo, aproximadamente entre el 5 y 20% de los pacientes con lupus discoide diseminado pueden desarrollar LES, con manifestaciones hematológicas, viscerales y títulos altos de anticuerpos antinucleares (20-22).

El fototropismo de las lesiones demuestra que la participación de la fracción UV sobre áreas expuestas a la luz,

Tabla 1. Características del lupus eritematoso cutáneo.

	LES/LECA	LED/LECC	LECS
Edad de inicio (años)	20-30	20-60	40-50
Género (F/M)	10/1	2/1	7/3
Eritema	Lesiones ligeramente edematosas o discoides	Lesiones discoides	Lesiones anulares o papuloescamosas
Fotosensibilidad	++	+	+++
Alopecia	+ (difusa)	+ (cicatrizal)	Rara
Úlceras orales	+ (no dolorosas)	No	Raro
Compromiso sistémico	++	Raro	Raro
Anticuerpos antinucleares	Anti-DNAds, anti-Sm	Negativo o títulos bajos	Anti-SS-A/Ro (60, 52 kDa)
EBL			
Lesión (%)	80-90	80-90	60 (UDE&NE)
No-lesión (%)	50	0	5

LES: Lupus Eritematoso Sistémico; LECA: Lupus Eritematoso Cutáneo Agudo; LED: Lupus Eritematoso Discoide; LECC: Lupus Eritematoso Cutáneo Crónico; LECS: Lupus Eritematoso Cutáneo Subagudo; Anti-DNAds: anticuerpos contra el DNA de doble cadena; EBL: Examen de la banda lúpica (mediante inmunofluorescencia indirecta en biopsia de piel); UDE: Unión dermoepidérmica; NE: tinción nuclear epidérmica.

es crítica para su desarrollo. Las áreas más afectadas son la cara, el cuero cabelludo, los pabellones auriculares, las manos y los antebrazos. El término discoide está relacionado con la forma de moneda que habitualmente presentan las lesiones, éstas son placas eritemato-escamosas, con un borde bien definido, de forma redonda, oval o policíclica. Cuando la lesión progresa la escama se hace más gruesa y adherente y se producen cambios pigmentarios, en el centro existe hipopigmentación y el borde activo presenta hiperpigmentación. El prurito y el dolor son ocasionales, la mayoría de los pacientes cursan asintomáticos. Las lesiones crecen en forma centrífuga y cuando se resuelven dejan atrofia y cicatrices, como es el caso de la alopecia cicatricial.

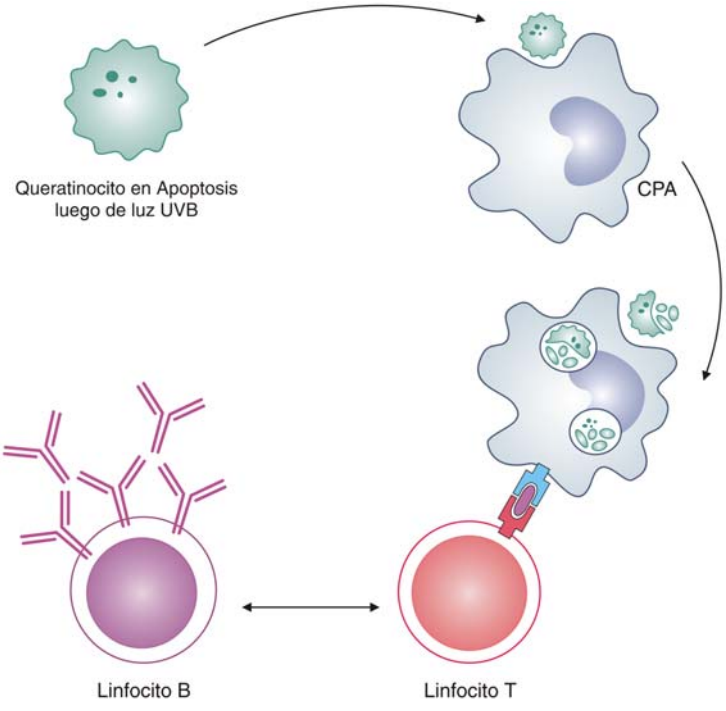


Figura 1.
Inducción de respuesta inmune luego de apoptosis de queratinocitos expuestos a la luz ultravioleta B (UVB).

La luz UV parece jugar un papel importante en la sobreexpresión de proteínas de shock térmico, las que parecen ser el blanco de las células Tγδ que inician la respuesta inflamatoria local, la respuesta de citotoxicidad mediada por células, la activación de linfocitos B con producción de autoanticuerpos y la formación *in situ* de complejos inmunes (Figura 1) (23). Los pacientes con Lupus discoide pueden presentar anticuerpos contra diversas proteínas, como: RNP, Ro, aparato mitótico, etc.

Lupus cutáneo subagudo

El lupus cutáneo subagudo corresponde a una variedad fotosensible de la enfermedad. Las lesiones cutáneas se caracterizan por lesiones anulares policíclicas, urticarianas y algunas adoptan apariencia psoriasiforme. A diferencia del lupus discoide, las lesiones de lupus subagudo no dejan cicatriz. Un 50% de los pacientes pueden reunir los criterios para clasificación de LES, además de las lesiones cutáneas, pueden presentar artralgias con o sin artritis y compromiso del estado general. En ocasiones, los pacientes presentan manifestaciones musculares, neurológicas o renales. En algunos casos las manifestaciones clínicas suelen asociarse a deficiencias de fracciones del complemento y estar asociadas a la presencia de anticuerpos anti-Ro y anti-La, constituyendo el rasgo distintivo de esta variedad de lupus cutáneo (Figura 2) (24,25).

LES

Las manifestaciones cutáneas del LES son comunes y pueden expresarse en su conjunto hasta en un 80% de los pacientes. Las más frecuentes son la vasculitis en acras y la *livedo reticularis*, la alopecia, y el exantema malar en «alas de mariposa» (Figura 3). Existen criterios de clasificación para el LES, señalados en el Capítulo 22 (26).

Los estudios de inmunofluorescencia directa de piel no expuesta a la luz solar muestran un patrón linear de

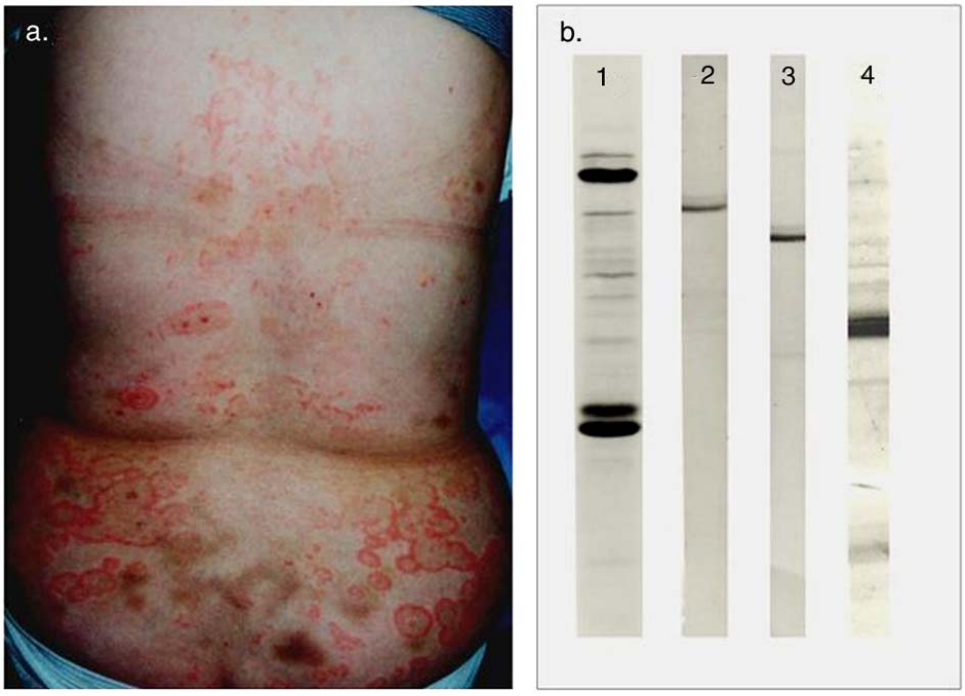


Figura 2.
Lupus cutáneo subagudo.
a. Dorso de paciente con lesiones eritematosas anulares policiclícas.
b. Autoanticuerpos más frecuentes:
1. Extracto de proteínas obtenidas de bazo humano.
2. Anti-Ro 60 kDa.
3. Anti-Ro 52 kDa.
4. Anti-La.

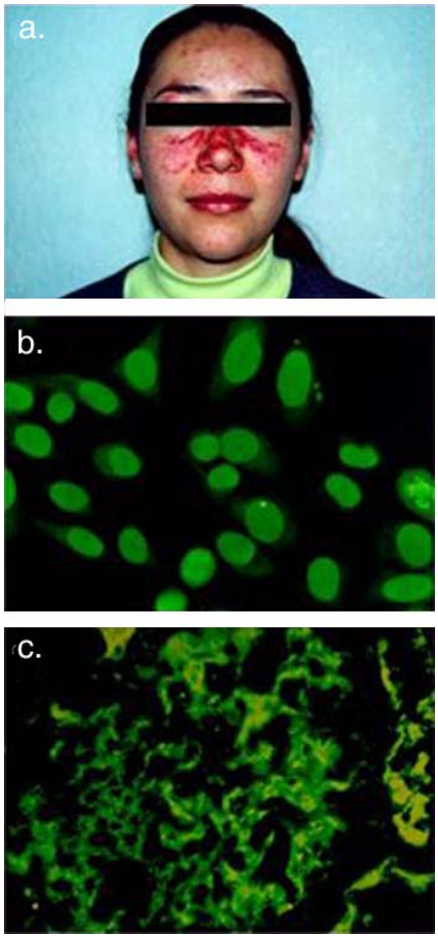


Figura 3.
a. Lupus eritematoso sistémico. Presencia de lesiones eritematosas en ala de mariposa. b. Anticuerpos antinucleares positivos con patrón homogéneo. c. Depósitos inmunes glomerulares de IgG.

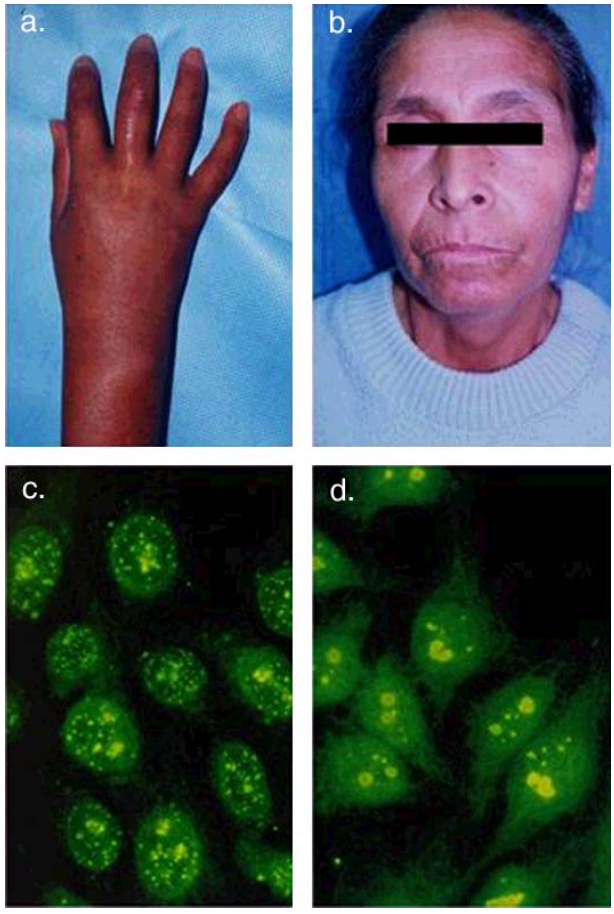


Figura 4.
Esclerodermia.
a. Esclerodactilia. b. Facies característica, con rasgos afilados y pliegues bucales ó regadías. c. Anticuerpos antinucleares con patrón de centrómero. d. Patrón nucleolar.

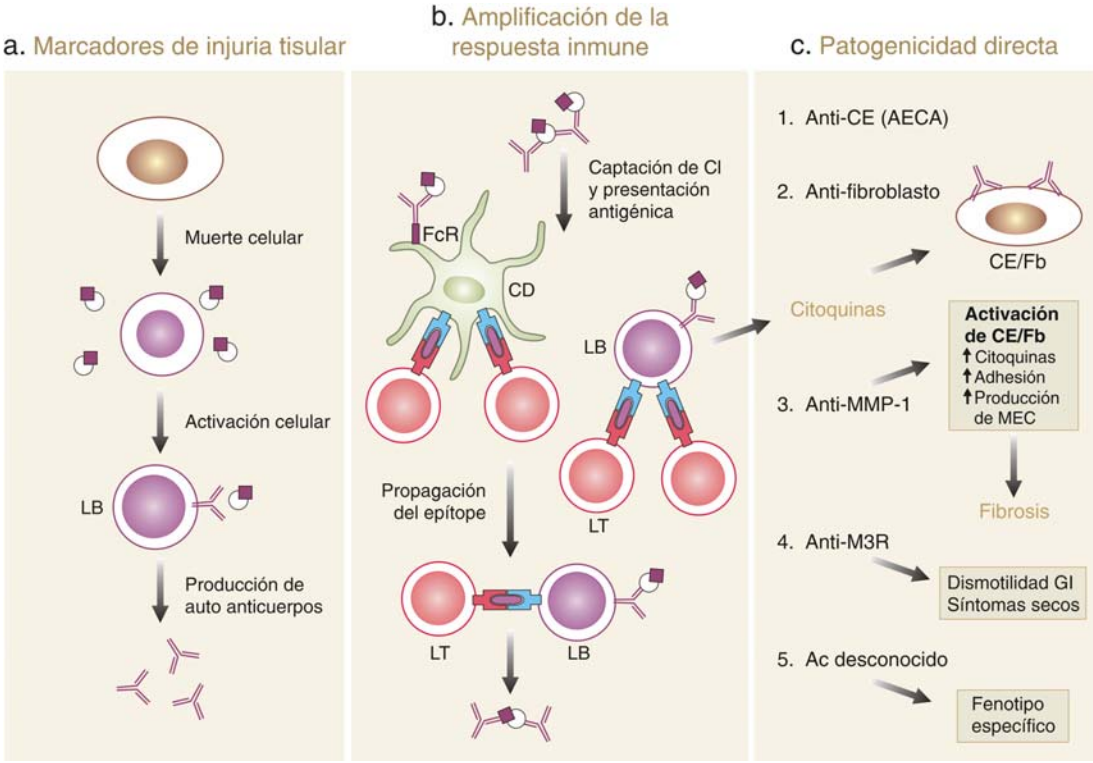


FIGURA 5.

Papel patogénico de los autoanticuerpos en la esclerodermia.

a. Los anticuerpos específicos pueden ser simplemente marcadores biológicos de lesión tisular. Como las células mueren en un estado proimmune, autoantígenos alterados pueden ser liberados y, concomitantemente, ser procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos, incluyendo las células B, a las células T ayudadoras; las cuales, a su vez, inducen activación celular B y síntesis de autoanticuerpos. b. Los autoanticuerpos pueden amplificar la respuesta autoinmune aumentando la eficacia de la captación de complejos inmunes (CI). También pueden alterar la presentación antigénica, permitiendo la aparición de antígenos crípticos. Este proceso puede conducir a la propagación del epítope. Además, las células T activadas, macrófagos y las células B pueden secretar citoquinas, las cuales pueden activar a las células endoteliales (CE) o a los fibroblastos (Fb), y promover fibrosis. c. Algunos autoanticuerpos asociados podrían participar en algunos fenotipos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA) y los anticuerpos anti-fibroblastos pueden activar estas células para producir citoquinas, moléculas de adhesión, y depósito de la matriz extracelular (MEC), contribuyendo de tal modo a la fibrosis. Los anticuerpos anti-MMP-1 (metaloproteinasa de la matriz-1), inhibirían la degradación de colágeno tipo I y III mediada por la MMP-1 y podrían aumentar también el depósito de MEC y la fibrosis. Los anticuerpos contra el receptor muscarínico M3 (M3R) podrían inducir síntomas de dismotilidad gastrointestinal y síntomas secos observados en algunos pacientes con Esclerodermia. Autoanticuerpos con especificidad aún no definida podrían estar asociados con otros fenotipos. LB: linfocito B, LT: linfocito T, CD: célula dendrítica

inmunoglobulinas y complemento en la unión dermo-epidérmica. El panel de autoanticuerpos presentes en estos casos son los anticuerpos antinucleares hasta en un 80% de casos y las especificidades más relevantes son contra nucleosomas, anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro y anti-La (27). Existen especificidades extrañas de autoanticuerpos, algunas asociadas a un extenso compromiso de mucosas, como es el caso de los anticuerpos anti-Coilina (28).

Estos pacientes también producen autoanticuerpos contra otros compuestos como los fosfolípidos y contra células completas como plaquetas, eritrocitos, neutrófilos y linfocitos. Los complejos inmunes en LES se depositan en la microvasculatura de la piel, articulaciones, riñones y pulmones, causan reclutamiento de células fagocíticas e inflamación. Cuando los complejos inmunes se forman en la circulación vascular, pueden causar coagulación y trombosis. Una de las manifestaciones más graves del LES es la nefritis (29,30).

Esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad de causa desconocida, que se caracteriza por una producción exagerada de moléculas que componen la matriz extracelular, particularmente colágena, la cual paralelamente al proceso inflamatorio produce fibrosis de los órganos internos. Existen muchas evidencias que sugieren que la lesión patológica es iniciada en la microvasculatura, y es seguida de trastornos de la regulación del control neurovascular para la vasodilatación. La disminución en la producción de óxido nítrico por las células endoteliales de la microvasculatura parece jugar un papel central la patogenia de la enfermedad (31). Los fibroblastos, además de producir matriz extracelular, aumentan la producción de endotelina 1. Las endotelinas corresponden a una familia de péptidos que se derivan del endotelio con amplia variedad de funciones, entre las que se destacan la inducción de vasoconstricción. El gen de la endotelina 1 es sobreexpresado durante el proceso de reparación, y su proteína promueve la

contracción y migración del fibroblasto. Los pacientes con esclerodermia tienen aumento en la producción de endotelina 1, cuyo efecto incrementa la expresión de proteínas procontráctiles como la α-actina de músculo liso, erzina, paxilina y moesina (32). La terapia biológica de la esclerodermia se enfoca a bloquear estas moléculas o a modificar los mecanismos de regulación génica. La enfermedad se asocia a autoanticuerpos contra moléculas del nucleolo o del centrómero-cinetocoro (Figuras 4 y 5) (33,34).

Dermatomiositis

Esta enfermedad pertenece a un grupo de miopatías inflamatorias autoinmunes, donde está también incluida la polimiositis, responsable de debilidad de grupos musculares proximales. Afecta tanto a niños como adultos (35). El daño tisular resulta de un mecanismo de hipersensibilidad celular y humoral de los músculos afectados. Los autoanticuerpos constituyen el común denominador de este grupo de enfermedades, particularmente el que está dirigido contra alguna de las aminoacil-tRNA sintetasas, siendo el más frecuente (25%) la especificidad anti-Jo, dirigido contra histidil-tRNA sintetasa. Otras especificidades contra alanil, aspargil, glicil, isoleucil o treonil-tRNA sintetasas se observan con menos frecuencia. La histidil y la aspargil-tRNA sintetasa tienen funciones proinflamatorias y actúan como quimio-atrayentes para las células Th1 sobre todo las que expresan CCR5, mientras que la aspargil induce a la migración de células que expresan CCR3. Ambas atraen a células dendríticas inmaduras al sitio de inflamación muscular. Este evento inicia la respuesta inmune adquirida de células T y B (36). Los autoantígenos aminoacil-tRNA sintetasas son liberados de los músculos dañados, lo que detona la respuesta inmune adquirida. Sin embargo, es enigmático lo que comienza el daño muscular. Por otro lado, se ha descrito un sistema de autoanticuerpos reactivos contra un complejo de proteínas conocido como polimiositis-esclerodermia (PM/Scl). Los pacientes con una enfermedad sobrepuesta de polidermatomiositis con esclerodermia producen autoanticuerpos contra este complejo molecular conocido como exosoma, involucrado en el procesamiento de los RNA largos (37). Uno de los complejos que participan en mantener los niveles correctos de RNA en células eucarióticas es el exosoma, que contiene exorribonucleasas 3'→5'. Estas enzimas limitan la destrucción de los mensajeros con elementos desestabilizantes ricos en AU RNAs (38,39).

Vasculitis

Las vasculitis corresponden a un grupo heterogéneo de síndromes caracterizados por inflamación de los vasos. En 1952, Zeek propuso la primera clasificación de vasculitis basada en el tamaño de los vasos que son afectados. Actualmente se utiliza la de Chapel Hill (40,41). La afección de los vasos produce diversos signos y síntomas comunes, que aunados a la inespecificidad de las lesiones histológicas hacen que el diagnóstico en algunos casos sea complejo (41). En el consenso de Chapel Hill fueron clasificadas las vasculitis en tres grandes grupos:

1. Vasculitis de grandes vasos, que incluyen a la arteritis de Takayasu y a la arteritis de células gigantes, caracterizadas ambas por una reacción granulomatosa de las paredes de las arterias afectadas.
2. Vasculitis que afectan vasos de mediano calibre entre ellas que la poliarteritis nodosa, que se caracteriza por necrosis de la pared vascular, con compromiso de capilares o vénulas.
3. Vasculitis de vasos de pequeño calibre, entre las que se incluyen a la granulomatosis de Wegener, que cursa con inflamación granulomatosa de vasos del tracto respiratorio, piel y riñón; el síndrome de Churg-Strauss, vasculitis necrotizante y granulomatosa, donde los eosinófilos tienen participación central y afecta el tracto respiratorio; la poliangeitis microscópica, vasculitis necrotizante de pequeños vasos, en particular capilares pulmonares; la púrpura de Henoch-Shönlein, causada principalmente por el depósito de IgA en vasos pequeños de la piel, riñón y tracto gastrointestinal (42).

Las vasculitis se caracterizan por un proceso inflamatorio del endotelio vascular, que puede involucrar pequeñas, medianas y grandes arterias. Los mecanismos fisiopatológicos son diversos. Algunas vasculitis de pequeños vasos son el resultado de hipersensibilidad humoral, en tanto que las de medianos y grandes vasos la participación de las células T parece jugar un papel central.

La glomerulonefritis constituye una forma común en algunas vasculitis necrotizantes de mediano y pequeño calibre. Por lo regular, está asociada a anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCAs). Éstos reconocen específicamente los gránulos primarios de los neutrófilos y los lisosomas de monocitos-peroxidasa positivos. Las dos especificidades antigénicas principales son la mieloperoxidasa (MPO.ANCA) y la proteinasa 3 (PR3-ANCA). Estos autoanticuerpos pueden activar los neutrófilos en ausencia de depósito de inmunoreactantes (43). Algunas citoquinas estimulan la redistribución de los gránulos a la superficie del neutrófilo. La MPO y PR3 interactúan con la porción Fab'_2 de los ANCA, en tanto que su porción Fc induce la expresión de receptores Fc-RII. La señalización celular de estos receptores produce un estallido respiratorio con producción de superóxido. Este mecanismo opera en forma dosis-dependiente (44,45). La patogenicidad de los ANCA ha sido confirmada en modelos experimentales que demuestran, la capacidad *in vitro* para activar neutrófilos y monocitos. Así mismo, los ANCA tienen la habilidad de inducir vasculitis y glomerulonefritis en modelos murinos (46).

Otras vasculitis de grandes vasos con manifestaciones muco-cutáneas incluyen a los síndromes de Kawasaki, Behçet, artritis reumatoide, sífilis y tuberculosis. Otras como la arteritis de Takayasu y la de células gigantes, cursan a veces con manifestaciones cutáneas (47). En éstas las células T $CD4^+$ y los macrófagos activados son los componentes mayores del infiltrado vascular. El daño in-

munológico ocurre en la adventicia, donde las células T reciben señales de estímulo para la expansión clonal, ahí liberan citoquinas, particularmente IFNγ. El blanco principal de esta citoquina son los macrófagos, que son reclutados a la pared del vaso, ocasionando una reacción granulomatosa intensa. Además, estas células pueden usar un amplio espectro de mecanismos efectores para causar daño estructural a la arteria (45,47).

Pénfigo

El nombre de esta enfermedad deriva del griego: *pemphix* = ampolla. Corresponde a un grupo de enfermedades autoinmunes ampollosas crónicas de la piel, que se caracterizan por el desarrollo de ampollas intraepidérmicas con autoanticuerpos dirigidos contra la superficie celular de los queratinocitos. Los anticuerpos causan pérdida de la adhesión entre las células epidérmicas, fenómeno conocido como acantolisis (48,49). Los anticuerpos en Pénfigo son de clase IgG y subclase IgG_1 e IgG_4 y tienen como blanco molecular a un componente normal de los desmosomas: la desmogleína. Esta estructura es la encargada del mantenimiento de las uniones célula-célula (50). La enfermedad tiene baja prevalencia (1/100,000) y se asocia a los subgrupos HLA-DR4 y -DR6.

Se desconoce su causa, los autoanticuerpos de Pénfigo inducen lesiones en animales experimentales; también la transferencia pasiva de autoanticuerpos patogénicos de clase IgG de la madre al recién nacido inducen Pénfigo neonatal (51-53). Un anticuerpo anti-idiotipo es capaz de neutralizar el efecto *in vivo* de la IgG de pénfigo (54).

El mecanismo completo de la acantolisis aún es desconocido; sin embargo, hay evidencia experimental que indica que una vez los autoanticuerpos se unen a la superficie celular se inicia una cascada de señalización mediada por calcio y proteínas quinasas, lo que a su vez induce fosforilación de la desmogleína, disociación de la placoglobina y ruptura del desmosoma. En este proceso se ha explorado el rol del activador del plasminógeno (uroquinasa) y su receptor, que activan la conversión de plasminógeno en plasmina e inducen digestión de los dominios extracelulares del desmosoma. El depósito de IgG de pénfigo en la epidermis sobrerregula la expresión de citoquinas inflamatorias tales como el TNFα, que potencialmente pueden causar apoptosis (55-57).

El diagnóstico de Pénfigo se establece con base a criterios clínicos (presencia de ampollas en mucosa oral y toda la superficie corporal), histológicos (ampollas intraepidérmicas y suprabasales en el caso del pénfigo vulgar y del vegetante, o subcórneas en pénfigo foliáceo). La inmunopatológia de piel no lesional muestra depósitos inmunes en la substancia intercelular de la epidermis. La serología demuestra la presencia de anticuerpos anti-epiteliales, cuya especificidad se determina por *Western blot*, ELISA o inmunoprecipitación. Los anticuerpos reconocen la desmogleína 1 y/o 3 (Figura 6) (58-60).

El pénfigo se clasifica en las siguientes variedades clínicas:

1. *Pénfigo Vulgar*. Es la forma más grave del padecimiento. Es más frecuente entre 40 y 60 años de edad; se inicia con úlceras dolorosas en la boca, que evolucionan en un período de semanas o meses, la piel presenta ampollas flácidas y frágiles que, al romperse, dejan la piel eritematosa y dolorosa. Frotando la piel normal es factible reproducir las ampollas (signo de Nikolski).

FIGURA 6.
Pénfigo.
a. Enfermedad generalizada con ampollas confluentes y zonas denudadas. b. Lesiones orales, características de Pénfigo vulgar. c. Anticuerpos anti-epiteliales, patrón típico en forma de red, sobre un epitelio bovino como fuente antigénica.

El estudio histológico muestra una ampolla suprabasal. En el suero existen autoanticuerpos antiepiteliales circulantes a títulos variables que se correlacionan con la actividad del padecimiento, y están dirigidos contra desmogleína 3. Esta proteína desmosomal es el antígeno del pénfigo vulgar.

2. *Pénfigo foliáceo.* Afecta a personas jóvenes y ocasionalmente a niños, con ampollas superficiales, frágiles, localizadas en la piel cabelluda, cara y tronco. No existen lesiones orales. Existe una forma epidémica en Brasil, llamada «Fogo Selvagem». El cuadro histológico e inmunopatológico es similar al de otras variedades de pénfigo. El pénfigo foliáceo no endémico, llamado también seborréico, es la forma más benigna de la enfermedad. Afecta predominantemente las áreas seborréicas, cabeza, cara, tronco.
3. *Pénfigo eritematoso.* Inicialmente llamado síndrome de Senear-Usher, se caracteriza por anticuerpos antiepiteliales asociados a anticuerpos antinucleares y una banda fluorescente en la unión dermo-epidérmica.
4. *Pénfigo vegetante.* Se caracteriza por lesiones en sitios de flexión, son por lo general, lesiones hipertróficas con ampollas en los bordes.
5. *Pénfigo paraneoplásico.* Los pacientes tienen pénfigo y una neoplasia concurrente, los anticuerpos antiepiteliales presentan especificidad múltiple contra desmogleína 3, plectina, antígeno del penfigoide buloso 1, desmoplaquina 1 y 2, envoplaquina, periplaquina y contra un péptido de 170 kDa.
6. *Pénfigo neonatal.* Es un padecimiento transitorio que se presenta en hijos de madres con pénfigo que cursan con títulos altos de anticuerpos antiepiteliales. Éstos cruzan la barrera placentaria y se depositan en la piel del recién nacido. El padecimiento se ha reportado en mujeres embarazadas con pénfigo vulgar o foliáceo.
7. *Pénfigo inducido por drogas*. Es raro, las manifestaciones son similares a otras formas de pénfigo. Los fármacos más frecuentemente asociados son la penicilamina y el captopril. Los anticuerpos son contra la desmogleína 1. Se piensa que la acantolisis es mediada directamente por toxicidad de la droga (61).

Penfigoide

Son un grupo de enfermedades autoinmunes poco frecuentes, caracterizadas por ampollas grandes, subepidérmicas, y presencia de autoanticuerpos dirigidos contra el hemidesmosoma, son de clase IgG y fijan complemento (62). La enfermedad se presenta en individuos entre 50 a 70 años de edad, y afecta con la misma frecuencia a hombres y mujeres. Tampoco tiene predilección racial. La evolución de la enfermedad es crónica, con períodos de exacerbaciones y remisiones. En la mayoría de los pacientes el padecimiento remite en 1.5 a 5 años. La etiología del penfigoide es desconocida; sin embargo, existe asociación con el alelo HLA-DQ1*0304 (63,64). Las lesiones pueden precipitarse por irradiación ultravioleta, rayos X y exposición a algunas drogas como furosemida, antiinflamatorios no esteroideos (p.ej. ibuprofen), captopril, penicilamina y antibióticos Los autoanticuerpos están dirigidos contra una proteína del hemidesmosoma. El antígeno del penfigoide buloso corresponde a una proteína con dos dominios uno citoplásmico de 230 kDa denominado BPAg1, y el otro de 180 kDa o BPAg2 que está dirigido contra colágena tipo XVII (65-67).

Los autoanticuerpos de penfigoide producen ampollas (68). Una vez se unen a la membrana basal epitelial, activan el complemento y promueven la migración de células inflamatorias y la liberación de mediadores solubles como la eotaxina (69-71), quimioquina selectiva de eosinófilos, en los que induce liberación de proteasas, lo que causa la degradación del hemidesmosoma y la formación de la ampolla (72).

Clínicamente, las ampollas del penfigoide se observan en toda la superficie corporal, principalmente en áreas de flexión, sobre una piel eritematosa; son grandes y en ocasiones el contenido es hemorrágico. Las formas clínicas son:

1. *Penfigoide ampolloso*. Corresponde a lesiones urticariformes que progresan a ampollas tensas que dejan un área denudada; generalmente no presentan signo de Nikolski.
2. *Penfigoide gestacional o Herpes gestationis*. Se asocia a embarazo, puerperio o desórdenes hormonales. Los tí-

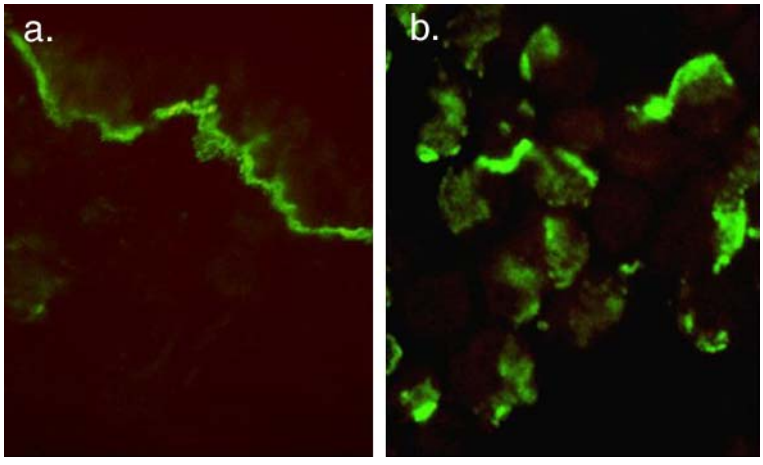


Figura 7.
Penfigoide.
a. Anticuerpos depositados en membrana basal.
b. Polarización característica del antígeno de penfigoide buloso en queratinocitos disociados y marcados con un suero de penfigoide.

tulos de anticuerpos son bajos, por inmunoblot se detectan solamente anticuerpos contra la proteína BP Ag180. En la biopsia, separada con solución salina hipertónica, la prueba de fijación de complemento es positiva y se conoce como factor HG.

3. *Penfigoide cicatricial*. Afecta mucosas y en ocasiones a la piel; produce cicatrices que afectan la función. Los anticuerpos están dirigidos contra la proteína de 180 kDa y contra otras proteínas como colágena VII y laminina 5 y 6 (73).

La piel con penfigoide muestra una ampolla subepidérmica con un infiltrado inflamatorio de linfocitos, polimorfonucleares y eosinófilos, dentro y por debajo de la ampolla. Los estudios de inmunofluorescencia directa muestran depósitos inmunes lineales de IgG y C3 a nivel de la membrana basal, en la unión dermo-epidérmica. Cuando la piel es separada con solución salina hipertónica, los anticuerpos se localizan en el techo de la ampolla (74). La detección de anticuerpos en el suero, de clase IgG y C3, se localizan en la unión dermo-epidérmica del epitelio usado éste, como fuente antigénica (Figura 7). Otros medios de detección de los anticuerpos son la inmunoprecipitación y las pruebas de ELISA donde se utilizan proteínas recombinantes de BPAg1 or BPAg2.

Dermatitis herpetiforme

La dermatitis herpetiforme, ó enfermedad Dürhing, es una enfermedad autoinmune, ampollosa de la piel que se asocia a enteropatía sensitiva al gluten (Enfermedad Celíaca, ver Capítulo 27b). Se presenta en cualquier edad; sin embargo, es más común entre la segunda y cuarta década de la vida. Es más frecuente en caucásicos y está ligada al haplotipo HLA-A1 HLA-B8 HLA-DQ2.

La enfermedad se manifiesta clínicamente por pápulas y vesículas muy pruriginosas, localizadas en las superficies extensoras. En ocasiones, las manifestaciones de enfermedad celíaca son asintomáticas, o bien presentarse con esteatorrea y síndrome de malabsorción con deficiencia de hierro y folatos.

Histológicamente por microscopía de luz se observa la presencia de ampollas a nivel de la unión dermo-epidérmica, con infiltrado de neutrófilos a nivel de papilas dérmicas. La inmunopatología revela depósitos inmunes de IgA granulares en la unión dermo-epidérmica. Puede también observarse depósitos de C3. También se ha observado aumento discreto de IgA sérica y la presencia de complejos inmunes circulantes de IgA, reactivos contra gliadina (un fragmento de la proteína del trigo) y contra endomisio. Se ha demostrado que la transglutaminasa tisular es el antígeno principal en la enfermedad celíaca. Se han encontrado también diversas asociaciones de dermatitis herpetiforme con atrofia gástrica (75,76).

Epidermolisis bulosa adquirida

Es una enfermedad autoinmune que se presenta entre la cuarta y sexta década de la vida; con ampollas adquiridas, sin historia familiar de enfermedad ampollosa, y anticuerpos de clase IgG contra la porción aminoterminal de la colágena tipo VII, constituyente de las fibras de anclaje localizadas en la unión dermo-epidérmica (77).

El cuadro clínico inicia con fragilidad cutánea y ampollas tensas en sitios de fricción, las lesiones son ocasionadas por pequeños traumatismos. Clínicamente se observan:

a. El fenotipo clásico, no inflamatorio o tipo mecanobuloso, consistente en fragilidad de la piel, ampollas provocadas por pequeños traumatismos y erosiones superficiales en zonas de roce (codos, rodillas, dorso de manos y pies) que dejan cicatrices y quistes de milium. Puede haber distrofia ungueal y alopecia cicatricial.
b. El fenotipo penfigoide ampolloso o inflamatorio, cuyas lesiones, al principio, son similares al penfigoide ampolloso, erupción diseminada en pliegues de flexión, manchas, placas y ampollas, sobre la piel eritematosa, no hay fragilidad cutánea y curan sin dejar cicatriz ni quistes de milium. Con el tiempo estos pacientes presentan características de EAA clásica; ésta es la forma más frecuente de presentación; este es un claro ejemplo de diseminación de epítopes.
c. El fenotipo penfigoide cicatricial, presenta ampollas y erosiones en piel cabelluda, cuello, mucosas de laringe, orofaringe, esófago, conjuntiva y genitales; curan con cicatrización que puede provocar ceguera, estenosis esofágica y otras alteraciones funcionales. Anteriormente se confundía con penfigoide cicatricial, ahora se sabe que son entidades distintas. En la biopsia se observa, en la forma clásica separación dermoepidérmica a nivel de la membrana basal con escasa o nula inflamación; mientras que el fenotipo penfigoide ampolloso o inflamatorio, muestra ampollas subepidérmicas y un infiltrado moderado o denso de neutrófilos principalmente. En la microscopia electrónica existe separación de la zona de la membrana basal debajo de la lámina densa y no hay reducción de las fibrillas de anclaje, a diferencia de EAB distrófica hereditaria. Por inmunofluorescencia directa se observan depósitos lineales a nivel de la unión dermo-epidérmica de IgG y C3, y ocasionalmente de IgM e IgA. Con la técnica de separación de la piel con NaCl la fluorescencia se ve en el lado dérmico, en el piso de la ampolla, a diferencia del penfigoide en donde la fluorescencia se encuentra en el lado epidérmico (74), por inmunoblotting los anticuerpos reconocen una banda de 290 kDA de extracto total de piel, consistente con colágena tipo VII y un dominio no-colágeno tipo 1 (77).

Referencias

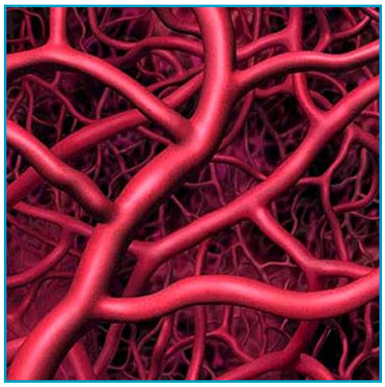
1. Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol Today 1992;13:11-6
2. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLr4 gene. Science 1998; 282:2085-8
3. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 2001;1:135-45
4. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon K. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. J Exp Med 1998;188:2313-20
5. Navratil JS, Korb LC, Ahearn JM. Systemic lupus erythematosus and complement deficiency: clues to a novel role for the classical complement pathway in the maintenance of immune tolerance. Immunopharmacology 1999;42:47-52
6. Johnson GB, Brunn GJ, Amy H, et al. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. Trends Immunol 2003;24:19-24
7. Mackay IR. Tolerance and autoimmunity. BMJ 2000;321:93-6
8. Rubin RL, Kretz-Rommel A. A nondeletional mechanism for central T-cell tolerance. Crit Rev Immunol 2001;21:29-40
9. Fatenejad S, Peng SL, Disorbo O, et al. Central T cell tolerance in lupus-prone mice: influence of autoimmune background and the lpr mutation. J Immunol 1998;161:6427-32
10. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, et al. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. Science 1999;285:2122-5
11. Vaishnaw AK, Orlinick JR, Chu JL, et al. The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. J Clin Invest 1999;103:355-63
12. Biedermann T, Röcken M, Carballido JM. TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune response of the skin. J Invest Dermatol Symp Proc 2004;9:5-14
13. Udey MC. Skin dendritic cells in immunity and autoimmunity. J Investig Dermatol Symp Proc 2004;9:15-7
14. Dupasquier M, Stoitzner P, Oudenaren A, Romani N, Leenen PJ. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. J Invest Dermatol 2004;123:876-9
15. Bancherau J, Steinman RM. Dendritic cells and control of immunity. Nature 1998;392:245-52
16. Herrera-Esparza R, Avalos-Díaz E. Autoinmunidad y Apoptosis. El lupus a un siglo de la propuesta de Erlich. Rev Mex Reumat 2002;17: 173-9
17. Rose NR. Autoimmune disease 2002: an overview. J Invest Dermatol Symp Proc 2004;9:1-4
18. Norris DA. Pathomechanisms of photosensitive lupus erythematosus. J Invest Dermatol 1993;100:58S-68S
19. Osmola A, Namysl J, Jagodzinski PP, Prokop J. Genetic background of cutaneous forms of lupus erythematosus: update on current evidence. J Appl Genet 2004;45:77-86
20. Font J, Cervera R, Ramos-Casals M, et al. Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center. Semin Arthritis Rheum 2004;33:217-30
21. Tebbe B, Mansmann U, Wollina U, et al. Markers in cutaneous lupus erythematosus indicating systemic involvement. A multicenter study on 296 patients. Acta Derm Venereol 1997;77:305-8
22. Provost TT, Herrera-Esparza R, Díaz LA. Nucleoprotein autoantibodies in lupus erythematosus. J Invest Dermatol 1985;85(1 Suppl):133-9
23. Villalobos-Hurtado R, Sanchez-Rodgriguez SH, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R. Possible role of Hsp70 in autoantigen shuttling to the dermo-epidermal junction in systemic lupus erythematosus. Reumatismo. 2003;55:155-8
24. Tebbe B. Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus. Clin Dermatol 2004;22:121-4
25. Black DR, Hornung CA, Schneider PD, Callen JP. Frequency and severity of systemic disease in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. Arch Dermatol 2002;138:1175-8
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:1271-7
27. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. Semin Arthritis Rheum 2004;34:501-37
28. Vazquez-Talavera J, Ramirez-Sandoval R, Esparza Ibarra E, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Autoantibodies against Cajal bodies in systemic lupus erythematosus. Med Sci Monit 2004;10: 130-4
29. Herrera-Esparza R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Diaz E. Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis. Lupus 1998;7:154-8
30. Badillo-Almaraz I, Daza L, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Glomerular expression of Fas ligand and Bax mRNA in lupus nephritis. Autoimmunity 2001;34:283-9
31. Romero LI, Zhang DN, Cooke JP, Avalos E, Herrera R, Herron GS. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. Vascular Medicine 2000; 5:147-58
32. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. Mol Biol Cell 2004;15:2707-19
33. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. Arthritis Res Ther 2003;5:80-93
34. Herrera-Esparza R, Kruse L, von Essen M, et al. U3 snoRNP associates with fibrillarin a component of the scleroderma clumpy nucleolar domain. Arch Dermatol Res 2002;294:310-7
35. Miller FW. Inflammatory myopathies: Polymyositis, Dermatomyositis,and related conditions. In: Koopman WJ, ed. Arthritis andAllied Conditions, 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000; 1562
36. Howard OM, Dong HF, Yang D, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. J Exp Med 2002;196:781-91
37. Brouwer R, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. Arthritis Res 2001;3:102-6
38. Haile S, Estevez AM, Clayton C. A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. RNA. 2003;9:1491-501
39. Raijmakers R, Schilders G, Pruijn GJ. The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. Eur J Cell Biol 2004;83:175-83
40. Rao JK, MD, Allen NB, Pincus T. Limitations of the 1990 American College of Rheumatology classification criteria in the diagnosis of vasculitis. Arthritis Rheum 1998;129:345-52
41. Jennette JC, Falk RJ. Small-Vessell vasculitis. N Engl J Med 1997; 337:1512-23
42. Herrera-Esparza R, Avalos-Díaz E. In vivo intracellular deposition of antinuclear antibodies in Henoch-Schönlein purpura. J Rheumatol 1982;9:811-2
43. D'Agati V. Antineutrophil cytoplasmic antibody and vasculitis: much more than a disease marker. J Clin Invest 2002;110:919-21
44. Mulder AH, Heeringa, Brouwer E, Limburg PC, Kallenberg CG. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process. Clin Exp Immunol 1994;98:270-8
45. Weyand CM, Goronzy JJ. Medium- and large-vessel vasculitis. N Engl J Med 2003;349:160-9
46. Xiao H, Heeringa P, Hu P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. J Clin Invest 2002;110:955-63
47. Weyand CM, Goronzy JJ. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica Ann Intern Med 2003;139:505-15
48. Avalos E, Patel H, Anhalt GJ, Diaz LA. Autoimmune injury of squamous epithelium by pemphigus autoantibodies. Br J Dermatol 1984;111: 359-65
49. Penneys NS. Focal adhesion kinase is expressed in acantholytic keratinocytes associated with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. Br J Dermatol 1996;135:592-4
50. Díaz LA, Gudice G. End of the century Overview of skin blisters. Arch Dermatol 2000;136:106-12
51. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals T, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med 1982; 306;1189-96
52. Moncada B, Kettelsen S, Hernandez-Moctezuma JL, Ramirez F. Neonatal pemphigus vulgaris: role of passively transferred pemphigus antibodies. Brit J Dermatol 1982;106:465-7
53. Avalos-Díaz E, Olague-Marchan M, López-Swiderski A, Herrera-Esparza R, Díaz LA. Transplacental passage of maternal pemphigus foliaceous autoantibodies induce neonatal pemphigus. JAAD 2000; 43:1130-4
54. Alvarado-Flores E, Avalos-Díaz E, Díaz LA, Herrera-Esparza R. Anti-Idiotype antibodies neutralize In vivo the blistering effect of Pemphigus foliaceus IgG. Scand J Immunol 2001;53:254-8
55. López-Robles E, Avalos-Díaz E, Vega-Memije E, et al. TNFα and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. Int J Dermatol 2001;40:185-8
56. Sánchez-Carpintero I, España A, Penacho B, et al. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. Br J Dermatol 2004;151:565
57. Espana A, Diaz LA, Mascaro JM Jr, et al. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. Clin Immunol Immunopathol 1997;85:83-9.

58. Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplasic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. J Clin Invest 1998;102:775-782
59. Hashimoto T, Amagai M, Garrod DR, Nishikawa T. Immunofluorescence and immunoblot studies on reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1. Epithelial Cell Biol 1995;4:63-9
60. Hashimoto T, Amagai M, Ning W, et al. Novel non-radioisotope immunoprecipitation studies indicate involvement of pemphigus vulgaris antigen in pemphigus paraneoplastic. J Dermatol Sci 1998;7:132-9.
61. Kitajima Y. Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. Arch Dermatol Res 2003;295:S17-S23
62. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, et al. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 1995;95:1539-44
63. Chan LS, Hammerburg C, Cooper KD. Significantly increased occurrence of HLA-DQB1*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. J Invest Dermatol 1997;108:129-32
64. Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, et al. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1*0301 is present in clinical variants of pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:8569-71
65. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, et al. Characterization of bullous pemphigoid antigen: A unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. Cell 1981;24:897-903
66. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, et al. Molecular heterogeneity of bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. J Immunol 1986; 136:1231-5
67. Ishiko A, Shimizu H, Kikuchi A, et al. Human autoantibodies against the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) bind only to the intracellular domain of the hemidesmosome, whereas those against the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2) bind along the plasma membrane of the hemidesmosome. J Clin Invest 1993;91:1608-15
68. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest 1993;92:2480-8.
69. Chen R, Ning G, Zhao M-L, et al. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. J Clin Invest 2001; 108:1151-8
70. O'Toole EA, Arami S, Guitart J, et al. Eotaxin, an eosinophil-specific chemoattractant, is upregulated in bullous pemphigoid lesional epidermis and in normal human keratinocytes stimulated by a pro-inflammatory cytokine IL-1 alpha. J Invest Dermatol 1997;108:546
71. Jean-Baptiste S, O'Toole EA, Chen M, et al. Expression of eotaxin, an eosinophil-selective chemokine, parallels eosinophil accumulation in the vesiculobullous stage of incontinentia pigmenti. Clin Exp Immunol 2002;127:470-8
72. Stahle-Backdahl M, Inoue M, Giudice GJ, et al. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. J Clin Invest 1994; 93:2022-30
73. Robledo-Prada MA, Diaz LA. Conceptos recientes de inmunopatología cutánea. Med Cutan Iber Lat Amer 2003;31:3-16
74. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, et al. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. J Invest Dermatol 2002; 118: 664-71
75. Marietta E, Black K, Camilleri M, et al. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. J Clin Invest. 2004;114:1090-7
76. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto SH, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. Exp Dermatol 2003;12:261-7
77. Fairley JA, Woodley DT, Chen M, Giudice GJ, Lin MS. A patient with both bullous pemphigoid and epydermolysis bullousa acquisita: an example of intermolecular epitope spreading. J Am Acad Dermatol 2004;51:118-22

30

VASCULITIS SISTÉMICAS

Guillermo Berbotto
Bernardo Pons-Estel



Contenido

Definición
Clasificación
Patogénesis
Consideraciones clínicas y terapéuticas
Arteritis de células gigantes
Arteritis de Takayasu
Angiítis aislada del sistema nervioso central
Enfermedad de Kawasaki
Panarteritis nodosa
Granulomatosis de Wegener
Poliangiítis microscópica
Síndrome de Churg-Strauss
Vasculitis por hipersensibilidad
Púrpura de Schönlein-Henoch
Vasculitis crioglobulinémicas
Síndrome de Behçet
Diagnóstico diferencial
Vasculitis asociadas a enfermedades autoinmunes reumatológicas

Las vasculitis corresponden a un grupo de enfermedades relativamente poco frecuentes, caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias y necrosis de la pared de los vasos sanguíneos. La severidad de la vasculitis se relaciona con el tamaño, número y sitio de vasos afectados. Estas entidades pueden estar aisladas a un solo órgano y ser de poca relevancia clínica o pueden involucrar múltiples órganos y vasos simultáneamente, poniendo en riesgo la vida de los pacientes. En el presente capítulo se realiza una revisión general y específica de las principales entidades que forman parte del grupo de las vasculitis.

Definición

El término *vasculitis* define un proceso clínico-patológico caracterizado por inflamación de los vasos sanguíneos, generalmente acompañado de necrosis de la pared vascular, que provoca como consecuencia oclusión e isquemia de los tejidos afectados.

En la mayoría de los casos, la etiología de las vasculitis es desconocida. Los avances en la microbiología y biología molecular han implicado más recientemente a los virus de la hepatitis B, hepatitis C y de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), como agentes causales de algunos casos de vasculitis. Sin embargo, es de prever que otros microorganismos, fármacos y agentes ambientales puedan desencadenar el proceso inmunopatogénico que conducen a la inflamación vascular.

La vasculitis es un proceso de origen multifactorial. En él intervienen distintos mecanismos patogénicos, coresponsables finales de la lesión de las células endoteliales (Tabla 1). Algunos de estos mecanismos patogénicos pueden ser observados en diferentes tipos específicos de vasculitis (Tabla 2); sin embargo, es posible que varios de ellos actúen de manera asociada, en el desarrollo de un síndrome en particular (1-3). Las vasculitis pueden ser clasificadas como *primarias* cuando la etiología es desconocida y no existe enfermedad concomitante o *secundarias* cuando la vasculitis es la expresión clínica de una enfermedad subyacente de origen infeccioso, autoinmune, neoplásico, etc.

Clasificación

A medida que se ha incrementado el conocimiento de nuevas enfermedades vasculíticas, se ha hecho evidente la necesidad de un sistema de clasificación (4). La mayoría se ha basado en el tamaño de los vasos comprometidos; así, la clasificación de Fauci contempló criterios anatomoclínicos y ha sido una de las más utilizadas (1,2) (Figura 1). En 1990, el Colegio Americano de Reumatología desarrolló un sistema de clasificación basado en la sensibilidad y especificidad de los datos de pacientes que presentaban formas bien definidas de las distintas vasculitis.

Tabla 1. Vasculitis: mecanismos patogénicos.

1.	Depósito de inmunocomplejos (ICs)
2.	Anticuerpos anti-células endoteliales (AECA)
3.	Anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos (ANCA)
4.	Lesión mediada por linfocitos T (HLA dependiente)
5.	Infección directa de la célula endotelial
6.	Participación del lecho vascular

Tabla 2. Mecanismos de daño vascular en vasculitis específicas.

A.	Mediada por inmunocomplejos patógenos
	· Enfermedad del suero
	· Poliarteritis nodosa de la hepatitis B
	· Púrpura de Schölein-Henoch
	· Crioglobulinemia mixta esencial
	· Vasculitis secundarias a enfermedades autoinmunes reumatológicas
B.	Mediada por anticuerpos anti-células endoteliales
	· Granulomatosis de Wegener
	· Panarteritis nodosa
	· Poliangeitis microscópica
	· Enfermedad de Kawasaki
	· Tromboangeitis obliterante
C.	Mediada por anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos
	· Granulomatosis de Wegener
	· Síndrome de Churg-Strauss
	· Poliangeitis microscópica
D.	Mediada por linfocitos T (formación de granuloma)
	· Arteritis de células gigantes
	· Arteritis de Takayasu
	· Granulomatosis de Wegener
	· Síndrome de Churg-Strauss
	· Enfermedad de Kawasaki

Esta clasificación es útil desde el punto de vista epidemiológico y para estandarizar grupos de pacientes, pero no supone una gran ayuda para que el médico pueda hacer un diagnóstico preciso en un determinado paciente, sobre todo en los estadíos iniciales de la enfermedad (5).

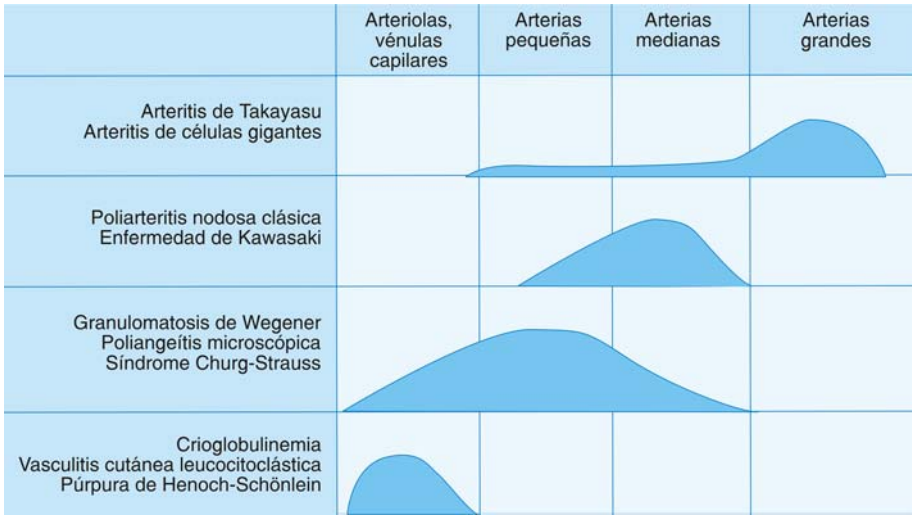


Figura 1.
Relación entre tamaño de los vasos sanguíneos y la clasificación de las vasculitis.

Tabla 3. Nombres y definiciones adoptadas por la Conferencia de Consenso de Chapel Hill para la nomenclatura de las Vasculitis Sistémicas.

Vasculitis de grandes vasos
· Arteritis de células gigantes: Arteritis granulomatosa de la aorta y de sus ramas principales, con predilección de las ramas extracraneales de la arteria carótida. A menudo involucra la arteria temporal. Afecta más comúnmente individuos mayores de 50 años y se asocia a menudo con polimialgia reumática.
· Arteritis de Takayasu: Inflamación granulomatosa de la aorta y de sus ramas principales. Usualmente ocurre en pacientes menores de 50 años.
Vasculitis de vasos medianos
· Poliarteritis nodosa: Inflamación necrotizante de arterias de mediano o pequeño calibre sin glomerulonefritis o vasculitis en arteriolas, capilares o vénulas.
· Enfermedad de Kawasaki: Arteritis que involucra arterias grandes, medianas y pequeñas y se asocia con síndrome linfo muco cutáneo. Las arterias coronarias están involucradas a menudo. Pueden comprometerse arteria aorta y venas. Usualmente ocurre en niños.
Vasculitis de pequeños vasos
· Granulomatosis de Wegener: Inflamación granulomatosa que involucra el tracto respiratorio y vasculitis necrotizante que afecta vasos de pequeño y mediano calibre (ej. Capilares, vénulas, arteriolas y arterias). Es común la presencia de glomerulonefritis necrotizante.
· Síndrome de Churg- Strauss: Proceso inflamatorio, rico en eosinófilos, que afecta el aparato respiratorio, y vasculitis necrotizante que compromete vasos de pequeño y mediano calibre y asociado con asma y eosinofilia.
· Poliangeitis microscópica: Vasculitis necrotizante con poco o ningún depósito inmune que afecta pequeños vasos (capilares, vénulas y arteriolas). Puede estar presente arteritis necrotizante que involucre arterias de tamaño pequeño o mediano. La glomerulonefritis necrotizante es muy común. A menudo ocurre capilaritis pulmonar.
· Púrpura de Henoch - Schölein: Vasculitis con depósitos predominantes de Ig A, comprometiendo pequeños vasos. Típicamente involucra piel, intestino y glomérulos; y está asociada con artralgias y artritis, sin vasculitis sistémica o glomerulonefritis.
· Vasculitis Crioglobulinémica esencial: Vasculitis con depósitos inmunes de crioglobulinas que afecta los pequeños vasos y que se asocia con crioglobulinemia. La piel y los glomérulos renales se afectan a menudo.
· Angeítis cutánea leucocitoclástica: Angeítis leucocitoclástica cutánea aislada, sin glomerulonefritis o vasculitis sistémica asociada.

En 1994, se reunió un comité de expertos en la Reunión Internacional de Consenso de Chapel Hill con el objetivo de acordar una nomenclatura para las vasculitis sistémicas (6). El motivo, fue tratar de estandarizar las definiciones y los términos diagnósticos (Tabla 3). No obstante, algunos puntos de controversia persisten.

Patogénesis

Cada una de las entidades clasificadas como vasculitis presentan mecanismos patogénicos diferentes, que serán evaluados en forma específica en cada una de ellas. Sin embargo, cada mecanismo propuesto para la patogénesis de las vasculitis requiere un evento disparador que activa células inflamatorias y endoteliales, con un incremento en las concentraciones de mediadores proinflamatorios de forma local y sistémica. Estos eventos iniciales no son conocidos en todos los casos de vasculitis. Todas estas entidades comparten un mecanismo final común de inflamación, necrosis y oclusión mediada por células endoteliales y leucocitos activados (Figura 2). La formación de complejos inmunes es uno de varios mecanismos específicos propuestos para la activación de células endoteliales, injuria y lisis. Otros mecanismos propuestos incluyen los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), anticuerpos anticélulas endoteliales (AECA), infección directa de la célula endotelial e injuria de la célula endotelial mediada por células. La localización y tipo de injuria tisular depende de la activación y potencialmente de las propiedades únicas de los diferentes lechos vasculares (1-3).

Consideraciones clínicas y terapéuticas generales

Las *manifestaciones clínicas* pueden ser tan prominentes que comprometan la vida, y tener expresiones multisistémicas que simulen, en ocasiones, otras enfermedades. Es prioritario establecer un diagnóstico con certeza, sustentado por el cuadro clínico, investigación de marcadores serológicos y generalmente confirmado por el estudio anatomopatológico y/o angiográfico (3).

La sospecha diagnóstica de los síndromes vasculíticos debe plantearse frente a una serie de condiciones clínicas, como puede observarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Sospecha de vasculitis sistémicas.

· Enfermedad multisistémica
· Nefropatía compatible con glomerulonefritis activa
· Signos y síntomas de isquemia
· Púrpura palpable
· Lesiones cutáneas nodulares y/o úlceras
· Mononeuritis múltiple y/o compromiso del sistema nervioso central
· Dolor o distensión abdominal y/o signos de perforación intestinal
· Infiltrados, nódulos y/o cavidades pulmonares
· Síndrome febril prolongado

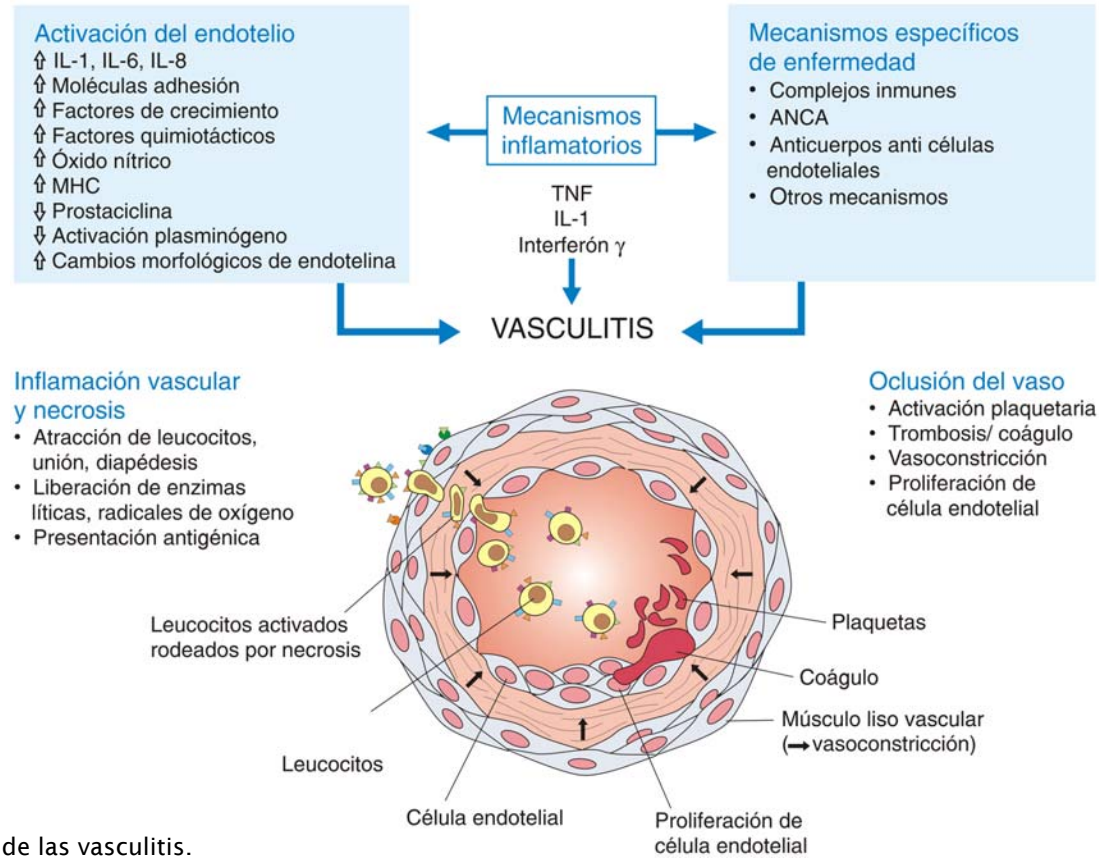


FIGURA 2.
Patogénesis de las vasculitis.

Una historia clínica completa y un examen físico adecuado son obligatorios, ya que la mayoría de los diagnósticos están definidos por los hallazgos clínicos en lugar de los de laboratorio.

Laboratorio, imágenes y biopsias

Aunque el diagnóstico de vasculitis habitualmente está basado en la presentación clínica, ciertos datos de apoyo son utilizados para consolidar el diagnóstico, definir la extensión de la enfermedad y el grado de lesión tisular, y guiar la elección terapéutica. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que sí el cuadro clínico dicta una acción terapéutica inmediata, puede no ser adecuado esperar los resultados de pruebas más sofisticadas o biopsias.

El nivel de inflamación se puede definir por la presencia de anemia, leucocitosis, trombocitosis, y elevación de la velocidad de eritrosedimentación (VSG) o de la proteína C reactiva (PCR).

Evaluación específica de cada órgano

La realización de pruebas para evaluar la afectación de un órgano está guiada por las manifestaciones clínicas y también incluye la realización de análisis de sangre de rutina y pruebas de imágenes.

Evaluación del tipo de vasculitis y su etiología

Estas pruebas son utilizadas en circunstancias clínicas específicas, guiadas por la presentación de la enfermedad y los resultados de las pruebas de rutina anteriores.

- *Valorar un desencadenante infeccioso*: hepatitis B ó C, VIH.
- *Valorar una enfermedad mediada por complejos inmunes*: Consumo de complemento, presencia de crioglobulinas (Ej. hepatitis C)
- *Valorar una enfermedad autoinmune*: por ejemplo descartar la presencia de lupus eritematoso sistémico (LES).

Evaluación específica de la enfermedad

Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCAs)

Estos anticuerpos son encontrados en el suero de pacientes con tipos específicos de vasculitis y son de ayuda como herramienta diagnóstica asociada en el contexto de un cuadro clínico consistente con Granulomatosis de Wegener (GW), poliangeitis microscópica (PAM), y síndrome de Churg-Strauss (SCS) (7,8). Dos patrones de tinción diferentes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) caracterizan estos anticuerpos: citoplásmico (c-ANCA), que corresponden a anticuerpos frente a la proteinasa 3, y perinuclear (p-ANCA), que reaccionan contra la mieloperoxidasa. Unos cuantos puntos sobre los ANCA son importantes:

a. La mayoría de los pacientes con GW son positivos para c-ANCA y la mayoría con poliangiítis microscópica y SCS son positivos para p-ANCA.
b. El diagnóstico definitivo de GW se basa en los resulta-

dos de la biopsia, no en la positividad de los ANCAs.
c. Las decisiones con respecto a la actividad de la enfermedad deben basarse en los signos clínicos, no en los títulos de ANCAs.
d. El 10% de los pacientes pueden ser negativos para ANCA en el contexto de vasculitis activa.

Biopsia tisular

Como cualquier prueba, una biopsia tisular debería tenerse en cuenta si es necesaria para definir un diagnóstico, orientar el tratamiento, o clarificar el pronóstico (9-11).

Métodos de imagen

La resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia magnética angiográfica y tomografía axial computarizada (TAC) pueden ser necesarias para definir la afectación específica de un órgano o la extensión de la enfermedad.

Angiografía

En circunstancias especiales puede añadir mucho a la exactitud diagnóstica y en la definición del tipo y extensión de la afección vascular (12,13). Esto es particularmente cierto cuando existen dudas de diagnóstico de la panarteritis nodosa (PAN) y arteritis de Takayasu luego de una profunda evaluación clínica inicial. Los aportes en angiítis primaria del sistema nervioso central resultan interesantes.

Últimamente la resonancia magnética angiográfica (angiorresonancia) está ganando interés como una prueba de evaluación no invasiva del compromiso vascular.

Valoración de la enfermedad

El grado de *actividad* es uno de los parámetros fundamentales para evaluar y refleja en forma directa el nivel de inflamación vascular, y es diferente al concepto de *daño* ya que éste se refiere a las lesiones irreversibles provocadas tanto por la enfermedad, como por las complicaciones o el tratamiento instituido.

La relación actividad/daño se relaciona con la reversibilidad de las lesiones vasculíticas y conduce nuestra acción terapéutica desde el uso de drogas citotóxicas en dosis altas o pulsos hasta el tratamiento de las complicaciones con rehabilitación, fisioterapia, asistencia psicológica y social entre otros.

Es importante, además, agregar el concepto de *función,* ya que debe tenerse en cuenta la forma en que el paciente está manejando la carga de la enfermedad y la repercusión que ésta tiene en su calidad de vida.

La valoración del grado de actividad puede realizarse con variables clínicas, de laboratorio o con la combinación de ambas.

Existen marcadores de inflamación inespecíficos, reactantes de fase aguda, que se alteran por cualquier evento que estimule el sistema inmunológico, Ej.: PCR, VSG, etc., y marcadores relativamente específicos de inflamación vascular como ANCA ó AECA, entre otros.

Con objeto de integrar las diversas variables que componen el espectro clínico de las vasculitis, investigadores del departamento de Reumatología de la Universidad de Birmingham (Reino Unido) han propuesto en los últimos años la utilización de tres índices estandarizados de valoración de la enfermedad, que se agrupan bajo la denominación de V.I.T.A.L (*Vasculitis Integrated Total Asessment Log-* Determinación del valor total integrado en vasculitis) (14-16). Estos parámetros son presentados a continuación:

1. B.V.A.S (*Birmingham Vasculitis Actvity Score-* Score de actividad)
2. B.D. I. (*Vasculitis Damage Index-* Índice de daño)
3. S.F. 36 (Índice funcional)

Consideraciones terapéuticas

La terapéutica de las vasculitis sistémicas (corticoides e inmunosupresores) ha modificado el curso natural de la enfermedad, transformando a una afección habitualmente mortal, en una enfermedad crónica, generando una demanda desproporcionada de recursos de salud como resultado de la cronicidad y del daño irreversible consiguiente a la enfermedad y al tratamiento (17,18).

La inmunosupresión lograda con corticoides y citotóxicos parece ser la piedra angular del tratamiento para alcanzar remisión de la enfermedad, pero esta asociación genera marcada toxicidad y en ocasiones eficacia parcial.

Una nueva situación que merece consideraciones especiales es la *terapia de mantenimiento* de la remisión, a través de nuevos agentes terapéuticos, o modificando el uso de drogas previamente conocidas.

La conducta terapéutica en los pacientes con vasculitis sistémica se puede dividir en dos: primero la *fase de inducción de remisión de la enfermedad* y segundo la *fase de mantenimiento*.

Con esta conducta surgen algunos problemas clínicos frecuentes como la falla en inducir una remisión total, y la falla en controlar la recidiva.

Basados en lo anterior, el esquema básico de tratamiento puede plantearse de la siguiente manera:

1. *Inducción de remisión (manejo "agresivo"):* que comprende entre otros el uso de *ciclofosfamida, pulsos de metilprednisolona, plasmaféresis e inmunoglobulinas endovenosas (Ig Ev)*.
2. *Mantenimiento (prolongado y no tóxico):* en este caso se necesitan *nuevos agentes, combinación de fármacos, ó uso de fármacos viejos.*
3. *Recaída/Fracaso de inducción:* se necesitan *nuevos productos de biotecnología: Ig Ev - Anticuerpos monoclonales*, etc.

Más allá de lo expuesto, los tratamientos disponibles son útiles, particularmente en la fase aguda. La mortalidad puede ser analizada de dos formas; precoz, donde la enfermedad activa es la responsable, o la muerte tardía en el curso de la patología como consecuencia de complicaciones de la terapia o de la enfermedad.

A continuación se revisan en forma específica los principales tipos de vasculitis.

Arteritis de células gigantes

La arteritis de células gigantes (ACG) afecta casi exclusivamente a personas mayores de 50 años, principalmente mujeres. Es una enfermedad inflamatoria vascular que compromete principalmente las ramas extracraneales de la aorta y respeta la circulación intracraneal. La inflamación transmural de las arterias induce oclusión de la luz vascular a través de la hiperplasia de la íntima. E1 compromiso de la arteria temporal puede ser uni o bilateral y característicamente focal y segmentario (19-21).

Los síntomas son reflejo de la isquemia generada, siendo clásicos la cefalea de reciente comienzo, el dolor en el roce de la región temporal, la claudicación mandibular y las alteraciones visuales, incluyendo la ceguera. Los síntomas oculares representan una emergencia y son el resultado del compromiso arterítico de los vasos del ojo. Se describen alteraciones de la visión en el 25-50% de los pacientes, aunque la incidencia de ceguera es mucho menor, 6-10%.

La lesión más común es la neuropatía óptica anterior isquémica. También pueden ocurrir diplopía y pérdida visual transitoria. La ceguera es la complicación más seria e irreversible. Generalmente es súbita, indolora y permanente. Hay riesgo de compromiso del otro ojo si el paciente no es tratado agresivamente, y puede ocurrir en las siguientes 24 horas.

Cuando la vasculitis compromete las arterias vertebrales pueden generarse accidentes cerebrovasculares isquémicos en territorio de la circulación posterior, vértigos, etc. El compromiso de arterias subclavias, axilares y humerales conlleva claudicación en los miembros superiores y asimetría o ausencia de pulsos. Una condición grave es la aortitis, cuyo riesgo de complicación culmina en la formación de aneurismas, disección, hemorragia y ruptura.

En el laboratorio se destaca la marcada elevación de la PCR y la VSG. El 30-40% de pacientes con arteritis temporal tienen asociada una polimialgia reumática.

El diagnóstico se confirma con la realización de la biopsia arterial. La biopsia debe incluir entre 2 y 4 centímetros y ser analizada con múltiples cortes. Del total de biopsias con resultados positivos, só1o el 50% evidencia el cuadro típico de arteritis granulomatosa con células gigantes. La otra mitad muestra un infiltrado inflamatorio mixto linfomononuclear, con algunos neutrófilos y eosinófilos. Es importante destacar que la positividad del examen anatomopatológico alcanza al 80% pre tratamiento, disminuyendo al 60% si la biopsia se realiza luego de 7 días de iniciado el tratamiento con esteroides. La biopsia de arteria temporal debería indicarse en un paciente con alta sospecha clínica cuado presente cefalea característica, dolor a la palpación de la arteria.

Frente a pacientes en los cuales los hallazgos clínicos sugieran compromiso arterítico de otros órganos, por afectación de grandes vasos, debe plantearse la realización de estudios angiográficos para definir el compromiso de arterias carótida, subclavia, y a menudo unión subclavia-axilar.

El Eco Doppler puede identificar sitios posibles de biopsia en arterias superficiales. El hallazgo más específico es un halo oscuro alrededor de la arteria que puede expresar la presencia de edema. Se observa disminución en la velocidad de flujo sanguíneo en la órbita y aumento en la resistencia vascular. Además de establecer bases fisiopatológicas para explicar las pérdidas de visión en arteritis de células gigantes, esta modalidad de estudio puede ser útil en el seguimiento de la patología ya que se ha demostrado luego del tratamiento esteroide normalización de los parámetros considerados.

El *tratamiento de la* ACG debe ser instituido en el momento de establecer el diagnóstico. El tratamiento de elección es la corticoterapia, generalmente administrada por vía oral en dosis de 40-60 mg día de prednisona, o equivalente en dosis única o repartida en forma inicial. En casos severos que se presentan con complicación visual (ceguera de instalación aguda) se ha observado un mejor pronóstico al administrar pulsos endovenosos de metilprednisolona en dosis habituales. El estricto monitoreo del riesgo de infecciones, control de glucemias y de tensión arterial además de la prevención de osteoporosis por corticoides con la administración de calcio, vitamina D y bifosfonatos, según corresponda, resultan tanto o más importantes que el tratamiento de la enfermedad en sí. El descenso de las dosis de corticoides puede iniciarse una vez que enfermedad ha entrado en remisión clínica y los parámetros de laboratorio, principalmente la PCR, la VSG y nivel de hemoglobina, regresan a límites normales.

En promedio, el tratamiento de la entidad oscila entre 18 y 24 meses. Más allá de los cuidados que se ponen en la terapia, algunos pacientes suelen recidivar y obligan a incremento de dosis transitoriamente. También es importante destacar que un pequeño grupo de pacientes lleva un curso crónico de la enfermedad que obliga al tratamiento con bajas dosis de prednisona por años con el fin de lograr un alivio sintomático.

Debemos recordar la polimialgia reumática, una entidad asociada frecuentemente con la ACG pero que puede presentarse también en forma aislada. Cabe destacar, en esta situación, que la dosis de corticoides es mucho menor (7,5-20 mg/día de prednisona) y que la respuesta clínica se observa tras la primera dosis del tratamiento.

Se ha planteado el uso de metotrexate, en pacientes que no responden a la terapia convencional, pero los resultados de los estudios de investigación han sido contradictorios. No obstante, en aquellos pacientes con alto riesgo de efectos adversos o que ya presenten efectos adversos intolerables a la corticoterapia la adición de metotrexate semanal sería una alternativa a evaluar.

Publicaciones aisladas abren alguna posibilidad terapéutica a agentes biológicos anti citoquinas, algunas drogas citotóxicas, entre otras. (22).

Arteritis de Takayasu

La arteritis de Takayasu es una vasculitis granulomatosa que compromete la aorta, sus ramas y las arterias pul-

monares (23,24). Las mujeres adolescentes y en la segunda y tercer década de la vida son las de mayor riesgo. Es una entidad frecuente en Japón, sudeste de Asia, India y México. Se caracteriza por un infiltrado inflamatorio panarterítico que causa un marcado engrosamiento de la arteria comprometida con el consiguiente estrechamiento luminal y posterior oclusión vascular. El cuadro clínico varía de una enfermedad asintomática y sin pulsos palpables a un cuadro catastrófico de afección del sistema nervioso central. La mayoría de los pacientes tienen pulsos disminuidos y asimetría en los registros de tensión arterial como consecuencia de estrechamiento de las arterias subclavias. El compromiso de carótidas conlleva el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico, vértigos, ceguera, etc. La presencia de hipertensión arterial puede orientar al diagnóstico de estenosis de la arteria renal.

Una de las mayores dificultades en esta enfermedad ha sido la evaluación de la actividad inflamatoria. La demostración de una oclusión vascular por medio de angiografía no puede diferenciar si se trata de un proceso activo o cicatrizal, lo cuál es esencial para definir el tipo de terapia (25).

En el *tratamiento* los corticoides resultan de elección en la enfermedad activa. El 40% de los pacientes requiere terapia citotóxica adicional para mantener la remisión, no obstante, las recidivas son frecuentes.

Diversos esquemas de tratamiento se han propuesto e involucran esteroides y diferentes agentes citotóxicos.

La cirugía cumple un rol muy importante en el manejo de este tipo de pacientes. Los procedimientos quirúrgicos, revascularización por by pass o angioplastia, deben considerarse en situaciones especiales entre ellas isquemias en miembros inferiores y a nivel cerebral, entre otras.

Angiítis aislada del sistema nervioso central

Esta es una enfermedad vasculítica recientemente reconocida, que afecta principalmente el sistema nervioso central (26). Los pacientes típicos están en la cuarta o quinta década de la vida. El comienzo es variable, habitualmente con un pródromo de 6 meses. El síntoma más común es la cefalea, que puede remitir espontáneamente durante largos períodos de tiempo. Son característicos los déficit neurológicos no focales, incluyendo una disminución en la función cognitiva. Cualquier área anatómica puede afectarse con signos y síntomas, que van desde ataques isquémicos transitorios, ictus, paraparesias, y neuropatías de pares craneales hasta convulsiones. Los hallazgos del análisis del líquido cefalorraquídeo son anormales en más del 90% de los pacientes e incluyen pleocitosis moderada, niveles normales de glucosa, y proteínas elevadas. El líquido cefalorraquídeo debe cultivarse y descartar infección. La RMN, la TAC y en especial la resonancia magnética angiográfica han hecho el diagnóstico más fácil; los hallazgos sugestivos incluyen infartos supratentoriales múltiples y bilaterales. La angiografía se ha mostrado con una utilidad variable. La confirmación histológica mediante la biopsia leptomeningea es el patrón a seguir. El tratamiento se realiza con corticoides y ciclofosfamida y habitualmente es mantenido durante 6 a 12 meses después de la remisión.

Enfermedad de Kawasaki

Es una enfermedad febril aguda de etiología desconocida, que ocurre más frecuentemente en bebés y en niños menores de 5 años (27,28). La vasculitis, especialmente de las arterías coronarias, es la complicación más seria. El inicio es típicamente abrupto, con fiebre alta remitente o continua que generalmente dura 1 a 2 semanas. A los 2 a 4 días del inicio, aparece congestión conjuntival bilateral. Se ha observado sequedad, enrojecimiento y aparición de fisuras en los labios a los 2 a 5 días, y puede verse una lengua "aframbuesada" (como en la escarlatina). Una linfadenopatía cervical dolorosa aparece transitoriamente antes o simultáneamente con la fiebre. La presencia de un exantema del tronco y enrojecimiento de palmas y plantas con la consiguiente descamación son habituales. Las lesiones de las arterias coronarias con dilatación o aneurisma pueden verse en la ecocardiografía. La angiítís de la enfermedad de Kawasaki habitualmente dura aproximadamente 7 semanas y es vista más frecuentemente en las arterias de calibre mediano y grande, incluyendo las arterias coronarias e ilíacas.

Si se detectan cambios en las arterias coronarias se administra una dosis alta de gammaglobulina endovenosa en forma de infusión aislada de 2 gr/kg de peso. Dosis bajas de aspirina, 3 mg a 5 mg/kg al día, son utilizadas hasta que regresan los cambios de las arterias coronarias.

Panarteritis nodosa

La Panarteritis Nodosa (PAN) es una vasculitis necrotizante con manifestaciones sistémicas como consecuencia del compromiso de arterias musculares de pequeño y mediano calibre.

Es característica la afección vascular segmentaria con predilección por los sitios de ramificación y bifurcación. Habitualmente respeta las venas, compromete arterias viscerales, pero en forma característica respeta la circulación pulmonar (29-31).

Considerando la etiología de la PAN, se distinguen formas primarias y secundarias a infecciones por virus B de la hepatitis (VHB) y otros agentes etiológicos (VIH, citomegalovirus, virus hepatitis C, etc).

Es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia anual de 0,7/100.000 y una prevalencia de 6.3/100.000 habitantes. Afecta hombres y mujeres por igual con un rango de edad entre 40 y 60 años.

La asociación de PAN y VHB ha variado entre el 15% y el 30%. La vacunación contra el VHB ha disminuido la aparición de la enfermedad a menos del 10%.

Se sugiere que la PAN es consecuencia del depósito en la pared vascular de complejos inmunes solubles de tamaño superior a 19S, llevando a la activación de los componentes de la cascada del complemento, migración

de leucocitos polimorfonucleares, con el consiguiente daño vascular.

Las lesiones vasculares desde el punto de vista anátomo patológico, son focales y segmentarias y la vasculitis necrotizante con necrosis fibrinoide es la lesión aguda. El compromiso sectorial puede dar origen a la formación de dilataciones vasculares de tipo microaneurismática. El infiltrado inflamatorio es transmural y está compuesto por células linfomonocíticas, neutrófilos y eosinófilos.

En el inicio de la enfermedad, la mayoría de los pacientes presentan síntomas generales, como fiebre, astenia, pérdida de peso y se muestran severamente enfermos.

La nefropatía vascular es la manifestación principal de la PAN. Se ve neuritis periférica en el 54% de los pacientes portadores de PAN y suele ser el primer síntoma de la enfermedad. Entre el 44% y el 62% de estos pacientes presentan afección del aparato digestivo. Los síntomas más frecuentes son náuseas, vómitos y dolor abdominal. Dependiendo de la severidad del compromiso del flujo sanguíneo a través de la arteria mesentérica superior o sus ramas, las manifestaciones varían desde el cuadro clínico de angina abdominal y esteatorrea a infartos masivos. El compromiso hepático puede estar ocasionado por la infección por el HBV o inducido por la vasculitis pudiendo ocasionar infartos hepáticos masivos o aneurismas de los vasos del hígado. El 20% de los pacientes presenta nódulos subcutáneos, expresión de los aneurismas arteriales.

Las mialgias y artralgias son manifestaciones frecuentes. La artritis suele ser una forma de presentación inicial caracterizada por un patrón de compromiso oligoarticular, de grandes articulaciones y de miembros inferiores.

El *diagnóstico* de PAN generalmente es difícil y retardado en el tiempo como consecuencia de la variabilidad en la presentación clínica.

El punto fundamental de diagnóstico de la PAN es el hallazgo anátomo-patológico de una vasculitis necrotizante de arterias de pequeño y mediano calibre (con necrosis fibrinoide), en un individuo con un cuadro clínico compatible. La arteriografía también permite el diagnóstico de PAN, cuando se pone en evidencia la presencia de aneurismas y estenosis en vasos de mediano calibre. Los aneurismas miden entre 1-5 mm y se encuentran en riñón, mesenterio e hígado.

Predecir el curso de la enfermedad con el tratamiento se torna dificultoso. Sin embargo se ha definido que el riesgo de muerte se incrementa ante el compromiso renal, gastrointestinal, miocárdico, del sistema nervioso central y ante pérdidas significativas de peso. Esta situación permitió definir el denominado *score* de cinco factores pronósticos.

- Proteinuria
- Creatininemia
- Compromiso tracto gastrointestinal
- Miocardiopatía
- Compromiso del sistema nervioso central

El pronóstico de la enfermedad en el momento del diagnóstico se definiría sobre la base de la ausencia o presencia de uno o dos o más de estos factores (Tabla 5). El conocer y aplicar racionalmente este puntaje de cinco factores ayuda al clínico a desarrollar un claro enfoque del pronóstico de la enfermedad.

El tratamiento de la PAN no asociada a VHB se basa en corticoides en altas dosis (prednisona 40-60 mg/día) con o sin la asociación de ciclofosfamida dependiendo de la severidad del cuadro. En la PAN asociada al virus B, esta terapia inmunosupresora puede facilitar la persistencia del virus facilitando el desarrollo de hepatitis crónica y cirrosis, por lo que se sugiere la combinación de antivirales, plasmaféresis y corticoides. Una vez alcanzada la remisión es rara la recaída.

TABLA 5. Valor predictivo de mortalidad del score de 5 factores.

Score	Mortalidad (%)	Sobrevida (%)	Riesgo relativo
0	12	88	0.63
1	26.25	73.75	1.38
2 ó más	45.95	54.05	2.4

Granulomatosis de Wegener

La Granulomatosis de Wegener (GW) es una enfermedad de etiología desconocida, que se caracteriza por el complejo clínico patológico de vasculitis necrotizante granulomatosa del tracto respiratorio superior e inferior, glomerulonefritis y vasculitis de pequeños vasos de grado variable (32,33).

Se ha revelado que la GW tiene un curso evolutivo en dos fases, la primera eminentemente granulomatosa, limitada, con compromiso del tracto respiratorio y buena respuesta terapéutica; la segunda es consecuencia de la evolución inicial sin diagnóstico donde el compromiso vasculítico generalizado afecta a los riñones originando una glomerulonefritis necrotizante con semilunas, o un cuadro de capilaritis a nivel pulmonar. Afecta pacientes de ambos sexos y en todas las edades.

La posibilidad de acción de agentes infecciosos como desencadenantes de la enfermedad no puede descartarse definitivamente. Se ha considerado que la enfermedad sería consecuencia de una reacción de hipersensibilidad asociada de linfocitos T y ANCA de la vía aérea, contra agentes infecciosos inhalados u otras sustancias orgánicas o inorgánicas. Si bien no existe un germen determinado como desencadenante, algunas evidencias implican al *staphylococcus aureus*. La portación nasal o la infección por este agente han sido observadas en las recaídas de la enfermedad.

Un capítulo interesante se abre con la presencia de los ANCA (34,35). Su rol patogénico se ha tratado de definir en este tipo de vasculitis. Así, los neutrófilos tendrían en su citoplasma aquellos antígenos (proteinasa 3 -PR3-) con capacidad de unión y reacción con los ANCA. Ante un estímulo determinado (ej: infección), los incrementos séricos de TNFα e IL-8 producirían la activación del

neutrófilo facilitando su degranulación y expresión en superficie de antígenos (PR3) generando la interacción con los ANCA. La PR3 en superficie puede ser bloqueada por α1-antitripsina (inactivador fisiológico). La unión de los ANCA, impediría este mecanismo defensivo favoreciendo la liberación antigénica y potenciando la respuesta inflamatoria. Ante los mismos estímulos la célula endotelial expresaría en superficie PR3 favoreciendo la unión de los anticuerpos con la consiguiente lisis celular (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos).

La GW es básicamente una enfermedad inflamatoria necrotizante, frecuentemente granulomatosa. La vasculitis (necrotizante o granulomatosa) es un componente secundario que ocurre en menos del 50% pudiendo afectar principalmente vasos de pequeño y mediano calibre.

Se describen formas localizadas sin compromiso renal. El curso puede ser indolente o rápidamente progresivo. Las formas leves suelen pasar sin ser reconocidas por meses o años.

Vías aéreas superiores

En la mayoría de casos la afección inicial es de nariz, oídos y orofaringe. El 60% de los pacientes presentan manifestaciones otológicas en el curso de la enfermedad. La otitis media serosa es la manifestación más común. Entre el 14-42% de los pacientes tienen pérdida de la audición (conductiva) como consecuencia de la otitis serosa o vasculitis en el oído interno.

El compromiso de senos paranasales se da entre el 50% y el 75% de los casos en su inicio. Los cambios erosivos destructivos se observan adecuadamente con la TAC. La mayoría de los pacientes evidencian infecciones secundarias por *Staphylococcus aureus* y en menor frecuencia *Hemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. La terapia inmunosupresora predispone a la infección sinusal por agentes oportunistas.

Vías aéreas inferiores

El compromiso pulmonar es el punto cardinal de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes son tos, disnea, hemoptisis y dolor torácico. Desde el punto de vista radiológico se destacan los infiltrados pulmonares con la particularidad de su aparición y desaparición periódica, aún antes del tratamiento. La persistencia del infiltrado obligaría a otros diagnósticos diferenciales. Los nódulos suelen ser múltiples bilaterales y cavitados. El derrame pleural sólo se ve en el 10% de los pacientes. En casos avanzados y severos suelen presentarse hemorragias pulmonares como consecuencia de capilaritis pulmonar (8%). Las pruebas de función pulmonar ponen de manifiesto patrones obstructivos como consecuencia de lesiones endobronquiales estenóticas. Suelen acompañarse de colapso pulmonar y neumonías obstructivas recurrentes. Resulta trascendente el diagnóstico diferencial ante compromiso pulmonar, con procesos infecciosos responsables hasta el 50% de la mortalidad, y de las manifestaciones dadas por la toxicidad pulmonar inducidas por drogas (ciclofosfamida).

Riñón

La presencia o ausencia de enfermedad renal define los subgrupos de formas generalizadas o localizadas. En ocasiones la nefropatía suele ser silente (sedimento y función renal normal) y *a posteriori* se presenta la glomerulonefritis. La presencia de hematuria sin cilindros obliga al diagnóstico diferencial con el compromiso vesical por ciclofosfamida y con la afección granulomatosa o vasculítica del tracto urinario inferior.

Otras manifestaciones de la GW incluyen inflamación ocular, lesiones cutáneas, artralgias, mialgias, y artritis, mononeuritis múltiple, polineuritis, neuropatías craneales y en forma excepcional cerebritis, convulsiones y eventos cerebrovasculares.

Hallazgos inespecíficos de laboratorio caracterizan la patología como la presencia de anemia normocítica normocrómica, leucocitosis leve, trombocitosis, VSG acelerada y PCR positiva. El análisis de orina muestra alteraciones del sedimento con microhematuria y cilindros hemáticos, y la función renal puede estar comprometida.

El panorama diagnóstico se modifica con la descripción de los ANCA. Los títulos de c-ANCA varían con la actividad de la enfermedad. No obstante, los cambios en los títulos de c-ANCA no serían marcadores sensibles de recidivas latentes.

Junto a los datos clínicos y de laboratorio, el examen anatomo-patológico demostrando angiítis granulomatosa es fundamental para el diagnóstico.

Toma de biopsias. ¿Cuándo realizarlas? ¿Qué material obtener?

Cuando la confirmación del diagnóstico se torna indispensable, el examen histopatológico alcanza su máximo valor. Hay limitaciones prácticas para obtener grandes muestras tisulares de pequeños sitios anatómicos (nariz, senos, laringe). La biopsia de senos paranasales brinda el mayor apoyo diagnóstico. Ante la necesidad de confirmación histológica de las lesiones pulmonares, se prefiere la toma de material a través de biopsias a cielo abierto en lugar de biopsias transbronquiales. El sedimento urinario patológico (hematuria, cilindros hemáticos) y/o las alteraciones de la función renal obligan a realizar una serie de diagnósticos diferenciales. El examen anátomo-patológico de biopsias renales contribuirá a dilucidar el problema.

Poliangiítis microscópica

La poliangiítis microscópica (PAM) es actualmente considerada como una enfermedad distinta de la PAN clásica, y definida como una vasculitis necrotizante sistémica con un cuadro clínico-patológico que es consecuencia de la afección de vasos microscópicos (arteriolas, capilares, vénulas) sin granulomas, pauci-inmune, asociada con glomerulonefritis necrotizante focal y segmentaria (30,36)

Ha generado confusiones el intento por diferenciar esta entidad de la PAN-clásica. Sin embargo, el carácter distintivo está dado por la presencia o ausencia del compromiso de vasos microscópicos en la PAM, dado que en ma-

yor o menor grado ambas pueden presentar vasculitis en vasos de mediano calibre.

Es una enfermedad con leve predominio en el sexo masculino (1,8:1), con mayor incidencia a partir de los 50 años de edad. Un curso indolente de semanas a meses, con síntomas constitucionales en el 60% de los casos, suele observarse antes de la fase "explosiva de la enfermedad". El compromiso renal y pulmonar, dominan el cuadro clínico. Es característica la presencia de una glomerulonefritis necrotizante segmentaria con ausencia o escasez de depósitos inmunes, con formación de semilunas, rápidamente progresiva y con deterioro de la función renal.

Como consecuencia de la capilaritis pulmonar, entre 12% y 19% de los pacientes presentan hemorragia pulmonar.

El diagnóstico diferencial con otros síndromes vasculíticos renales-pulmonares, como la GW, el LES y el síndrome de Goodpasture, puede ser difícil, pero se basa principalmente en la presencia de autoanticuerpos específicos de cada patología, como c-ANCA, anti-DNA y anticuerpos antimembrana basal, respectivamente.

En general, el pronóstico de la enfermedad es pobre. Los resultados favorables en el tratamiento se logran fundamentalmente cuando se ha llegado precozmente al diagnóstico. La lesión renal es el principal determinante. El tratamiento precoz, antes que se presenten las alteraciones en la función renal, marcará la diferencia.

Con tratamientos oportunos la sobrevida y la preservación de la función renal oscilan entre el 55-65% a los 5 años. Las causas principales de muerte son la insuficiencia renal, hemorragia pulmonar y los efectos adversos de la terapia.

Síndrome de Churg-Strauss

El síndrome de Churg-Strauss (SCS) se caracteriza por compromiso frecuente de vasos pulmonares, vasculitis de vasos de diverso tipo y calibres, granulomas intra y extravasculares, infiltrados tisulares eosinofílicos y asociación con asma y eosinofilia periférica (37,38). Es una rara enfermedad, que comienza más allá de los 40 años, sin diferencias significativas con relación al sexo con una etiología desconocida.

Las dos lesiones esenciales para el diagnóstico son:

- Angiítis (granulomatosa o no) que compromete tanto arterias como venas incluyendo vasos pulmonares.
- Granulomas necrotizantes extravasculares usualmente con infiltrados eosinófilos.

Se caracteriza por la aparición de vasculitis sistémicas e infiltrados pulmonares en un paciente con diagnóstico de asma de años de evolución, eosinofilia periférica (mayor de 1500/mm^3) y vasculitis sistémica que compromete dos o más órganos extrapulmonares. Se considera que la enfermedad evoluciona en tres fases, la primera alérgica (rinitis, poliposis nasal, asma), la segunda caracterizada por eosinofilia tisular y periférica y la tercera vasculítica, no siendo indispensable la aparición sucesiva de fases sino que pueden hacerlo en forma simultánea.

Las neuropatías periféricas, usualmente mononeuritis múltiple, se presentan entre un 64% y un 75% de los pacientes. La hipertensión arterial se encuentra en el 50% de casos.

Dentro de los datos de laboratorio se destacan la leucocitosis con eosinofilia (mayor de 1000/mm^3), VSG acelerada y p-ANCA (+).

Como conclusión, destacamos en la Tabla 6 las características clínicas relevantes de las vasculitis asociadas a ANCA.

Tabla 6. Comparación de las manifestaciones clínicas de la GW, PAM y el S.C.S.

Manifestación	G.W	PAM.	S.C.S
Asma	0	0	++++
Eosinofilia (sangre y tejidos)	+/–	0	++++
Historia de alergia	0	0	++++
Tracto respiratorio superior	+++	+	++
Tracto respiratorio inferior	+++	+	+++
Glomerulonefritis	++	++++	+
Lesiones cutáneas	++	++	+++
Mononeuritis múltiple	++	+	+++
Lesión ocular	++	+	0
Síntomas articulares	++	++	++
Enfermedad cardíaca	+/–	+/–	++

GW: Granulomatosis de Wegener; PAM: poliangeítis microscópica; SC-S: Síndrome de Churg-Strauss.

Tratamiento de la vasculitis ANCA positivas

La GW es una enfermedad que sin tratamiento tiene una sobrevida de 5 meses. El uso combinado de corticoides y ciclofosfamida alcanza remisiones entre el 80 y 100% de los casos (39-43). Sin embargo, este régimen está asociado con múltiples efectos adversos importantes.

La combinación de ciclofosfamida-prednisona es la terapia inicial en la mayoría de los pacientes, fundamentalmente con una enfermedad que ponga en riesgo la vida del paciente o esté en peligro la función de un órgano blanco. La ciclofosfamida es indicada por vía oral en dosis de 1,5-2 mg/kg/día.

Los corticoides, usualmente prednisona 1mg/kg/día vía oral, cumplen con el objetivo de reducir la inflamación aguda hasta que la ciclofosfamida inicie su efecto dentro de los 7 a 14 días. Se continúan por lo menos un mes y si se observa una mejoría significativa se puede descender lentamente la dosis en 5-10 mg/semana.

La terapia combinada se mantiene en las dosis propuestas hasta que se alcanza la remisión de la enfermedad, lo cual puede lograrse en meses ó 1 a 2 años. En este momento el tratamiento de mantenimiento es instaurado.

Otras alternativas a la terapia convencional, como el uso de ciclofosfamida intravenosa se han propuesto pero con algunas controversias. Otra posibilidad es la combinación de prednisolona más metotrexate en pacientes con compromiso orgánico leve como nódulo pulmonar o infiltrado mínimo, afección de vías aéreas superiores, o glomerulonefritis con sedimento activo pero con creatini-

nemia normal. Es una indicación atractiva en pacientes con historia de toxicidad de médula ósea, o de injuria vesical por ciclofosfamida.La *plasmaféresis* tendría un rol beneficioso en situaciones clínicas muy precisas (44-45) como en hemorragia pulmonar severa, pacientes con vasculitis asociada a ANCA pero con anticuerpos anti membrana basal glomerular (anti -MBG) positivos y pacientes con falla renal dependiente de diálisis más allá de la forma de presentación.

Enfermedad resistente a ciclofosfamida

Algunas conductas terapéuticas se pueden establecer en los pacientes que no responden a la ciclofosfamida. Por ejemplo, si el paciente recibía ciclofosfamida mensual endovenosa esta se puede pasar a vía oral diaria. Si la dosis diaria era de 1,5-2 mg/kg/día, se puede plantear como alternativa aumentar hasta 3-4 mg/kg/día con estricto control del recuento leucocitario. Si aún la actividad de la enfermedad no puede ser controlada, se podría considerar el uso de terapia anti-citoquinas (etanercept, infliximab), anticuerpos anti CD-20 (rituximab), etoposide, Ev Ig, etc. (46-51).

Terapia de mantenimiento

Recordamos que la terapia combinada de ciclofosfamida-prednisona es útil en inducir remisión de la enfermedad, prevenir recaídas y disminuir la mortalidad. Sin embargo, la cronicidad de la terapia resulta en inaceptables efectos adversos. Tradicionalmente la terapia citotóxica ha sido utilizada hasta 12 meses después de alcanzada la remisión. En este punto se pueden considerar drogas alternativas.

Bajas dosis de metotrexate oral semanal son efectivas como terapia de mantenimiento (52). La azatioprina es una droga poco útil para inducir remisión, pero una alternativa válida como terapia de mantenimiento. El trimetoprin-sulfametoxazol tiene un efecto incierto. De aquellas primeras observaciones que hablaban de su eficacia en enfermedad inicial leve sin compromiso cierto de función de órgano vital, hoy se plantean múltiples dudas. Una alternativa que podría explicar su utilidad está dada por la asociación de infecciones y la portación nasal crónica de *S. aureus* con la inducción de actividad de la enfermedad. Es posible que la liberación de citoquinas inducidas por la infección favorezca la activación de neutrófilos con la consiguiente expresión en superficie de proteinasa 3 y MPO, blancos antigénicos para los ANCA. El rol antiinfeccioso de la droga podría así justificar la indicación.

La ciclosporina A podría ser de algún beneficio como terapia de mantenimiento dado su acción supresiva sobre la célula T (53). Las dosis de 3-5 mg/kg/día permitirían mantener un nivel sérico aceptable (60-90 ng/ml).
El mofetil micofenolato se ha mostrado eficaz en estudios preliminares en mantener remisión en pacientes con GW (54).

En conclusión las únicas drogas demostradas como útiles en mantener remisión de la actividad de las vasculitis asociadas a ANCA son la ciclofosfamida, metotrexate y azatioprina.

Vasculitis por hipersensibilidad

El Colegio Americano de Reumatología (ACR), propone en 1990 los siguientes criterios de clasificación (55):

- Edad > de 16 años
- Uso de una posible droga responsable del cuadro con una relación temporal con los síntomas.
- Púrpura palpable
- Brote maculopapular
- Biopsia de piel que muestre infiltrado neutrofílico alrededor de arteriolas y vénulas.

La presencia de tres o más de estos criterios tendrían una sensibilidad y especificidad del 71 y 84% respectivamente en avalar la posibilidad de que estemos ante una cuadro de vasculitis por hipersensibilidad.

Las vasculitis por hipersensibilidad, es un cuadro originado en la producción de complejos inmunes. Conocer el antígeno permitirá orientar la terapéutica. Como la entidad es generalmente producida por fármacos que actúan como haptenos, debemos descartarlas como antecedente en los 7 a 10 días previos, principalmente el uso de penicilina o derivados, cefalosporinas, sulfonamidas, diuréticos, fenitoína, allopurinol. A su vez, debemos recordar a otros antígenos que pueden desencadenar el síndrome, infecciosos (virus B y C de la hepatitis, HIV, endocarditis infecciosas, dispositivos intravasculares infectados, etc), tumorales (enfermedades linfoproliferativas), etc. El tratamiento se basa en retirar el antígeno responsable (fármacos) y con ello suele ser suficiente. Ante la presencia de prurito o urticaria se indican antihistamínicos, o un corto curso de bajas dosis de corticoides si los síntomas o las lesiones cutáneas son severas. En algunas instancias las lesiones de piel se prolongan en el tiempo, el cuadro se torna crónico y el agente causal no es reconocido. En estos casos, podrían indicarse antiinflamatorios no esteroides, antihistamínicos, pentoxifilina, colchicina o dapsona. En casos seleccionados, antes de tomar una conducta más agresiva como el uso crónico de corticoides con o sin drogas citotóxicas asociadas (metotrexate, azatioprina), la combinación de pentoxifilina y dapsona se ha mostrado como una alternativa eficaz.

Púrpura de Schölein-Henoch

La *púrpura de Schölein-Henoch* (PS-H) es la forma de vasculitis sistémica más común en la infancia y afecta fundamentalmente niños entre dos y diez años de edad (56-58). Es considerado un subgrupo de vasculitis por hipersensibilidad y se caracteriza por depósito vascular de complejos inmunes con predominancia de Ig A, y preferentemente compromete vénulas, capilares y arteriolas.

Es un síndrome caracterizado por la tétrada de púrpura palpable, artritis, compromiso gastrointestinal y nefritis. Pero es habitual la presencia de formas incompletas.

La enfermedad a menudo comienza después de una infección del tracto respiratorio superior y es de inicio agu-

do. Su incidencia en la población de 2 a 14 años de edad es de alrededor de 14 por 100.000 por año.

Las lesiones cutáneas constituyen las manifestaciones capitales de la PS-H. El brote puede comenzar como eritema macular o urticaria pero posteriormente se vuelve purpúrico. Los sitios más comunes son las extremidades inferiores y los glúteos. Las manifestaciones articulares comprenden artralgias o artritis. Las manifestaciones gastrointestinales más comunes constituyen los cólicos abdominales que pueden acompañarse de vómitos. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan melena o diarrea con sangre. Desde el punto de vista anátomo patológico se comprueba una vasculitis en la submucosa con edema y hemorragia de la pared intestinal. Una complicación posible es la intususcepción o la perforación intestinal. El compromiso renal en la PS-H ocurre en aproximadamente el 40% de los pacientes, como hematuria o proteinuria; por lo general es transitorio, y en sólo un 10-20% de los casos se comprueba alteración de la función. Un 5% de los pacientes evolucionan a insuficiencia renal crónica.

En los adultos la diferenciación con vasculitis por hipersensibilidad puede ser difícil, pero la demostración de depósitos de Ig A en los vasos por inmunofluorescencia es diagnóstica.

La mayoría de los niños con PS-H presentan un proceso que dura por lo general menos de un mes; sin embargo, hasta un 40% de los pacientes tienen recurrencias luego de un período libre de enfermedad que puede ser tan largo como dos años, aunque por lo general es de unos pocos meses.

Debido al excelente pronóstico de la patología, el tratamiento sintomático es suficiente para la mayoría de los pacientes. En aquellos casos en que se detecta enfermedad renal progresiva, el uso de glucocorticoides e inmunosupresores podrían estar indicados, aunque esto es motivo de controversias.

Vasculitis crioglobulinémica

Es una entidad caracterizada por la inflamación de la pared de los vasos desencadenada por el depósito de crioglobulinas (59). Típicamente, es posible detectar en el suero crioglobulinas mixtas y factor reumatoide, así como valores disminuidos de complemento.

La crioglobulinemia mixta es en muchos casos inducida por la infección del virus C de la hepatitis (60,61). La principal indicación para una terapia activa es la presencia de una enfermedad sistémica progresiva, afectando pequeños vasos, riñón, hígado y sistema nervioso periférico.

La terapia agresiva en la crioglobulinemia mixta idiopática es primariamente reservada para pacientes con enfermedad aguda severa con compromiso progresivo en la función renal, necrosis digital con amputación o neuropatías graves (62,63). En ellos se usa la plasmaféresis (64), la administración de metilprednisolona en pulso endovenoso y ciclofosfamida.

Si se confirma la existencia de infección por virus C de la hepatitis, y tras la terapia inicial agresiva (2-4 meses), debe plantearse el tratamiento antiviral (62). Las recomendaciones generales se basan en la combinación de interferón alfa pegilado y rivabirina. Si el paciente tiene alteración en la función renal (clearance de creatinina < de 50 ml/min) solo interferón alfa no pegilado debería ser puesto en consideración terapéutica. Se ha reportado el uso de anticuerpos anti-CD20 (rituximab) para el tratamiento de los casos refractarios (65,66).

Síndrome de Behçet

Es una vasculitis sistémica que afecta a las arterias y venas caracterizada por la presencia de úlceras aftosas orales y genitales recurrentes, uveítis recurrente crónica, y una variedad de manifestaciones cutáneas, incluyendo la reacción de patergia (hiperreactividad inespecífica de la piel), eritema nudoso, y tromboflebitis superficial (67). La uveítis puede conducir a ceguera hasta en el 20% de los pacientes con enfermedad ocular Los pacientes varones y jóvenes tienen un curso más severo que las mujeres y los pacientes mayores. El síndrome de Behçet se ha asociado con el HLAB51. La historia natural es de exacerbaciones y remisiones.

Las úlceras orales y genitales leves pueden tratarse con corticoides orales. La talidomida también ha sido utilizada con éxito para tratar las lesiones mucocutáneas. La colchicina, que tradicionalmente ha sido utilizada para todos los aspectos del síndrome de Behçet. parece ser efectiva principalmente para el tratamiento de las lesiones mucocutáneas en mujeres. La inmunosupresión es el soporte principal del tratamiento para la enfermedad ocular. La azatioprina se ha demostrado que mantiene la agudeza visual y previene nueva afectación ocular, y la ciclosporina A es utilizada para los brotes de enfermedad (68,69).

Enfermedades que simulan vasculitis

Dado que el diagnóstico definitivo de vasculitis no es sencillo, debemos descartar cuidadosamente los múltiples procesos que simulan esta enfermedad, principalmente para establecer un pronóstico tratamiento acorde con la patología (70).

Las enfermedades que simulan vasculitis pueden agruparse, según el mecanismo fisiopatológico implicado, en enfermedades embólicas, enfermedades que causan estenosis o espasmo y enfermedades que originan trombosis vascular (Tabla 7).

Vasculitis asociadas a enfermedades autoinmunes reumatológicas

Dentro del contexto clínico de las enfermedades difusas del tejido conectivo, es frecuente observar fenómenos vasculíticos (71-73). Por ejemplo, casos de vasculitis en LES revertirán con el tratamiento de la enfermedad de base.

Otro tipo de vasculitis es la vasculitis reumatoidea, la cuál, típicamente compromete pequeños vasos y se pre-

Tabla 7. Enfermedades que simulan vasculitis.

Enfermedades embólicas		Estenosis o espasmo vascular	Trombosis vascular
Grandes vasos	Corazón		
Embolia ateromatosa	Endocarditis infecciosa	Aterosclerosis y Tromboangeitis obliterante	Coagulación intravascular diseminada
	Mixoma auricular	Displasia fibromuscular y eritema pernio	Púrpura trombocitopénica trombótica
		Vasoespasmo inducido por drogas: cocaina, ergotamina, anfetaminas, etc.	Necrosis por dicumarínicos
			Síndrome antifosfolípido

senta entre un 2-5% de pacientes con AR. Afecta a pacientes con enfermedad de larga evolución (mayor de 10 años), con positividad y en altos títulos para el factor reumatoide, con erosiones óseas y nódulos reumatoides. La vasculitis cutánea es la principal manifestación, y en general no reviste mayor gravedad llegando a padecerla el 90% de los pacientes en el curso de la enfermedad. El tratamiento no va más allá de esteroides tópicos y mantener la terapia habitual con la droga modificadora de la enfermedad que el paciente esté recibiendo. Resulta trascendente definir si la lesión cutánea es la única manifestación vasculítica o ésta forma parte de un grave compromiso sistémico. El diagnóstico deberá ser confirmado por biopsia de la estructura orgánica comprometida dado que la certeza del diagnóstico es sinónimo de terapéutica agresiva. Los datos con que contamos nos obligan a tratar a este tipo de pacientes con esquemas terapéuticos combinados similares a los utilizados en las vasculitis asociados a ANCA (ciclofosfamida-prednisona). Los resultados han sido satisfactorios. Merece una mención especial que la utilización en pulso endovenoso mensual de ciclofosfamida fue efectiva y con menor toxicidad que con la administración crónica por vía oral.

Un capítulo interesante se abre a partir de la utilización de terapias anti citoquinas en AR. Los resultados aún son anecdóticos como para sacar conclusiones. No obstante, informes preliminares resultan alentadores.

La duración de la terapia es incierta, aunque se aconseja continuar el tratamiento hasta los 6-12 meses posteriores a que la remisión ha sido alcanzada.

Conclusión

Debe quedar en nuestro conocimiento que enfrentarnos a un paciente portador de un síndrome vasculítico, genera un enorme desafío al juicio y razonamiento clínico. La determinación del tipo de enfermedad, grado de actividad, severidad del daño ocurrido y el estado funcional del paciente, serán fundamentales antes de tomar una conducta terapéutica. Recordar que el paciente no solo muere por vasculitis sino por complicaciones de la terapia. Una decisión acertada permitirá no sólo una mejor sobrevida sino también una adecuada calidad de vida.

Referencias

1. Fauci AS. Vasculitis. J Allergy Clin Immunol 1983; 72:211-23.
2. Fauci AS. Vasculitis: new insights amid old enigmas. Am J Med 1979;67:916-8
3. Battagliotti CA, Pons Estel B, Berbotto GA, Kilstein J. Vasculitis sistémicas. Toma de decisiones. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Segunda Edición. Rosario. 2001
4. Hunder GG, Arend WP, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: introduction. Arthritis Rheum 1990; 33:1065-7
5. Alarcon-Segovia D. The necrotizing vasculitides. A new pathogenetic classification. Med Clin North Am 1977; 61:241-60
6. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides: Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum 1994; 37:187-92
7. Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody testing in vasculitides. Rheum Dis Clin North Am 1995; 21: 987-1011
8. Gross WL, Csernok E. Immunodiagnostic and pathophysiologic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis. Curr Opin Rheumatol 1995; 7: 11-9
9. Dahlberg P, Overholt E, Lockhart J. Diagnostic approach to vasculitis. In: Churg A, Churg J, eds. Systemic vasculitides. New York:Ikagu-Shoin; 1991:41-54
10. Lie JT. Illustrated histopathologic classification criteria for selected vasculitis syndromes. American College of Rheumatology Subcommittee on Classification of Vasculitis. Arthritis Rheum 1990; 33:1074-87
11. Gabriel SE, O'Fallon WM, Achkar AA, Lie JT, Hunder GG. The use of clinical characteristics to predict the results of temporal artery biopsy among patients with suspected giant cell arteritis. J Rheumatol 1995; 22:93-6
12. Albert DA, Rimon D, Silverstein MD. The diagnosis of polyarteritis nodosa. I. A literature-based decision analysis approach. Arthritis Rheum 1988; 31:1117-27
13. Hellmich B, Voswinkel J, Aries PM, Gross WL. Primary systemic vasculitides: diagnostic pathways. Dtsch Med Wochenschr 2004; 129: 1322-7
14. Bacon P, Moorts R, Exley A. Vital assessment of vasculitis. Clin Exp Rheumatol 1995,13:275-278
15. Luqmani, R, Bacon P, Moots R. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotyzing vasculitis. Q J Med 1994; 87:671-8
16. Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, et al. Development and initial validation of the vasculitis damage index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. Arthritis Rheum 1997; 40: 371-80
17. Leavitt RY, Fauci AS. Therapeutic approach to the vasculitic syndromes. Mt Sinai J Med 1986 53:440-8
18. Uthman I. Pharmacological therapy of vasculitis: an update. Curr Opin Pharmacol 2004; 4:177-82
19. Gran JT, Myklebust G, Wilsgaard T, Jacobsen BK. Survival in polymyalgia rheumatica and temporal arteritis: a study of 398 cases and matched population controls. Rheumatology (Oxford) 2001; 40:1238-42
20. Sailler L. What have we learned about giant cell arteritis during the last decade? Rev Med Interne 2004; 25:816-25
21. Mandell BF. Polymyalgia rheumatica: clinical presentation is key to diagnosis and treatment. Cleve Clin J Med 2004; 71:489-95.
22. Gause A, Arbach O, Lamprecht P. Treatment of primary systemic vasculitis with TNF alpha-antagonists. Z Rheumatol 2003; 62: 228-34.

23. Frankel SK, Sullivan EJ, Brown KK. Vasculitis: Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, microscopic polyangiitis, polyarteritis nodosa, and Takayasu arteritis. Crit Care Clin. 2002; 18:855-79
24. Johnston SL, Lock RJ, Gompels MM. Takayasu arteritis: a review. J Clin Pathol 2002; 55:481-6
25. Kissin EY, Merkel PA. Diagnostic imaging in Takayasu arteritis. Curr Opin Rheumatol 2004; 16:31-7
26. Younger DS. Vasculitis of the nervous system. Curr Opin Neurol 2004; 17:317-36
27. Shulman ST, Rowley AH. Advances in Kawasaki disease. Eur J Pediatr 2004; 163:285-91
28. Burns JC, Glode MP. Kawasaki syndrome. Lancet 2004; 364:533-44.
29. Herbert CR, Russo GG. Polyarteritis nodosa and cutaneous polyarteritis nodosa. Skinmed 2003; 2:277-83
30. Lhote F, Guillevin L. Polyarteritis nodosa, microscopic polyangeiitis and Churg-Strauss syndrome. Clinical aspects and treatment. Rheum Dis Clin NA 1995; 21:911-47
31. Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, et al. Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. Medicine 1996; 75:17-28
32. Duna GF, Galperin C, Hoffman GS. Wegener's Granulomatosis. Rheum Dis Clin NA 1995;21: 949-86
33. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, et al. Wegener Granulomatosis: An analysis of 158 patients. Ann Intern Med 1992; 116:488-98
34. Kallenberg CG, Rarok A, Stegeman CA, Limburg PC. New insights into the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. Autoimmun Rev 2002; 1:61-6
35. Csernok E. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. Autoimmun Rev 2003; 2:158-64
36. Bacon PA, Savage C, Adu D. Microscopic polyarteritis (MPA).Edited by Ansell B.M, Bacon P.A, Lie J.T and Yazici H. Chapman & Hall Medical. London. 1996:135-44
37. Lanham JG, Elkon KB, Pusey CD, Hugues GR. Systemic vasculitis with asthma and eosinophilia. A critical approach to the Churg-Strauss syndrome. Medicine 1984; 63:65-81
38. Abril A, Calamia KT, Cohen MD. The Churg Strauss syndrome (allergic granulomatous angiitis): review and update. Semin Arthritis Rheum 2003; 33:106-14
39. De Groot K, Gross WL. Wegener's granulomatosis: Disease course, assessment of activity and extent and treatment. Lupus 1998; 7:285-91
40. Langford CA. Wegener's granulomatosis: current and upcoming therapies. Arthritis Res Ther. 2003; 5:180-91
41. Langford CA. Treatment of ANCA-Associated vasculitis. N Engl J Med 2003; 349:3-5
42. Langford CA. Chronic immunosuppresive therapy for systemic vasculitis. Curr Opin Rheumatol 1997; 9:41-47.
43. Guillevin L, Pagnoux C. When should immunosuppressants be prescribed to treat systemic vasculitides?. Intern Med. 2003;42: 313-7
44. Klemmer PJ, Chalermskulrat W, Reif MS, Hogan SL, Henke DC, Falk RJ. Plasmapheresis therapy for diffuse alveolar hemorrhage in patients with small-vessel vasculitis. Am J Kidney Dis 2003; 42:1149-53
45. Guillevin L, Pagnoux C. Indications of plasma exchanges for systemic vasculitides. Ther Apher Dial 2003;7:155-60
46. Schmitt WH, Hagen EC, Neumann I, Nowack R, Flores-Suarez LF, van der Woude FJ. European Vasculitis Study Group. Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients. Kidney Int 2004; 65:1440-8
47. Lamprecht P, Gross WL. A brief history of Wegener's granulomatosis: on limited, localized, and generalized forms of the disease: comment on the article by the Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. Arthritis Rheum 2004; 50:334-5
48. Booth A, Harper L, Hammad T, et al. Prospective study of TNFalpha blockade with infliximab in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. J Am Soc Nephrol 2004;15:717-21
49. Rozin A. Infliximab efficiency in refractory Wegener's granulomatosis. Rheumatology (Oxford) 2003; 42:1124-5
50. Langford CA, Balow JE. New insights into the immunopathogenesis and treatment of small vessel vasculitis of the kidney. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003;12:267-72
51. Specks U, Fervenza FC, McDonald TJ, Hogan MC. Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy. Arthritis Rheum 2001; 44:2836-40
52. Langford CA, Talar-Williams C, Barron KS, Sneller MC. Use of a cyclophosphamide-induction methotrexate-maintenance regimen for the treatment of Wegener's granulomatosis: extended follow-up and rate of relapse. Am J Med 2003;114: 463-9
53. Inoue K, Kondo M, Inoue M, Ishino H, Kamitsuji Y, Sano H. Successful treatment with combination therapy of cyclophosphamide and cyclosporin for late recurrence of Wegener granulomatosis. Arch Intern Med 2000; 160:393-4
54. Langford CA, Talar-Williams C, Sneller MC. Mycophenolate mofetil for remission maintenance in the treatment of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 2004;51:278-83
55. Calabrese LH, Michel BA, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of hypersensitivity vasculitis. Arthritis Rheum 1990;33:1108-13
56. Llan Y, Napartek Y. Henoch- Schonlein syndrome in adults and children. Semin Arthritis Rheum 1991;1: 103-9
57. Goldstein A, White R, Akuse R, Chantler C. Long-term follow up of childhood Henoch- Schonlein nephritis. Lancet 1992; 339:280-2
58. Szer I. Henoch- Schonlein purpura. Curr Opin Rheumatol 1994; 6:25-31
59. Agnello V, Chung R, Kaplan L. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. N Engl J Med 1992; 327:1490-5
60. Sene D, Limal N, Cacoub P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. Metab Brain Dis 2004;19:357-81
61. Han SH. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B. Clin Liver Dis 2004; 8:403-18
62. Zuckerman E, Keren D, Slobodin G, et al. Treatment of refractory, symptomatic, hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon-alpha. J Rheumatol 2000; 27:2172-8
63. Guillevin L. Virus-induced systemic vasculitides: new therapeutic approaches. Clin Dev Immunol 2004; 11:227-31
64. Hausfater P, Cacoub P, Assogba U, Lebon P, Piette JC. Plasma exchange and interferon-alpha pharmacokinetics in patients with hepatitis C virus-associated systemic vasculitis. Nephron. 2002; 91:627-30
65. Arzoo K, Sadeghi S, Liebman HA. Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). Ann Rheum Dis 2002; 61:922-4
66. Roccatello D, Baldovino S, Rossi D, et al. Long-term effects of anti-CD20 monoclonal antibody treatment of cryoglobulinaemic glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 2004;19:3054-61
67. Marshall SE. Behcet's disease. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2004;18: 291-311
68. Arayssi T, Hamdan A. New insights into the pathogenesis and therapy of Behcet's disease. Curr Opin Pharmacol. 2004;4:183-8
69. Evereklioglu C. Managing the symptoms of Behcet's disease. Expert Opin Pharmacother 2004; 5:317-28
70. Battagliotti CA, Kilstein J. Enfermedades que simulan vasculitis. En Battagliotti CA, Pons Estel B, Berbotto GA, Kilstein J. Vasculitis sistémicas. Toma de decisiones. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Segunda Edición. Rosario. 2001
71- Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL. No decrease over time in the incidence of vasculitis or other extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis: results from a community-based study. Arthritis Rheum 2004; 50: 3729-31
72. Calamia KT, Balabanova M. Vasculitis in systemic lupus erythematosis. Clin Dermatol 2004; 22:148-56
73. Roguedas AM, Misery L, Sassolas B, Le Masson G, Pennec YL, Youinou P. Cutaneous manifestations of primary Sjogren's syndrome are underestimated. Clin Exp Rheumatol 2004; 22: 632-6

31

¿SON LAS ESPONDILOARTROPATÍAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES?

Gabriel Jaime Tobón
José Fernando Camargo
Juan-Manuel Anaya

Las espondiloartropatías son un grupo de enfermedades musculoesqueléticas, inflamatorias, crónicas, cuya presentación clínica se sobrepone, y que incluyen la espondilitis anquilosante, la artritis reactiva y la artritis asociada con psoriasis y con enfermedad intestinal inflamatoria. El sitio primario de la lesión es la entesis (lugar de inserción de los ligamentos y tendones en el hueso) a nivel del esqueleto axial, incluyendo principalmente las articulaciones sacroiliacas; aunque las articulaciones de las extremidades y algunas otras estructuras no articulares pueden afectarse, tales como el intestino, la piel, la coroides en el ojo y la válvula aórtica. Las espondiloartropatías ocurren en individuos genéticamente predispuestos y son disparadas por factores ambientales. La asociación con el HLA-B27 es característica de la entidad; sin embargo, esta asociación varía entre las distintas espondiloartropatías y entre los grupos étnicos. Los mecanismos que subyacen este proceso no están, todavía, bien definidos. Como consecuencia, el tratamiento es empírico, aunque las terapias biológicas parecen ofrecer mejores resultados que la terapia convencional.

Contenido

Espondilitis anquilosante
Artritis reactiva
Artritis psoriática
Artritis enteropática
Patogénesis
Aspectos genéticos
Tratamiento

Las espondiloartropatías (SpA) constituyen un grupo de enfermedades músculoesqueléticas, crónicas, inflamatorias, interrelacionadas y sobrepuestas entre sí, que incluyen la espondilitis anquilosante -EA- (la forma más típica de SpA), la artritis reactiva -ARe-, la artropatía psoriática, la artritis asociada con la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, y una forma de artritis crónica juvenil (1-8). Algunas condiciones adicionales, menos definidas son clasificadas como SpA no diferenciadas (9,10). Una evidente diferenciación entre las diversas formas, sobre todo en las fases iniciales de la enfermedad no siempre es fácil, debido a que las manifestaciones se sobreponen entre ellas. Sin embargo, esta falta de diferenciación no afecta las decisiones terapéuticas.

El sitio patológico primario incluye las entesis, que corresponde a los sitios de inserción en el hueso de los diferentes ligamentos y tendones, las articulaciones sacroilíacas y el esqueleto axial, las articulaciones de las extremidades, principalmente en miembros inferiores, y algunas estructuras no articulares, como el intestino, la piel, los ojos y la válvula aórtica (11-18). Las entesis están distribuidas en todo el cuerpo, y muchos sitios, predominantemente el esqueleto axial y los miembros inferiores pueden estar involucrados en el proceso inflamatorio. La entesitis se da por lo general en sitios que soportan gran estrés físico. Además, se ha propuesto que la modulación de la respuesta inmune específica del tejido que lleva a fibrosis, más que a lisis celular, en los sitios sometidos a estrés (por ejemplo, el esqueleto axial, la aorta ascendente, el tracto uveal anterior, y los ápices pulmonares), puede explicar la distribución de las lesiones (19).

Tabla 1. Manifestaciones de las espondiloartropatías.

- Sacroiliítis radiológica con o sin espondilitis
- Artritis periférica, entesitis y dactilitis
- Asociación con enfermedad inflamatoria intestinal crónica
- Asociación con psoriasis u otras lesiones mucocutáneas
- Tendencia a inflamación ocular anterior
- Incremento en la incidencia familiar
- Aortitis y bloqueo cardíaco
- No asociación con el factor reumatoideo
- Fuerte asociación con el HLA-B27

Tabla 2. Asociación de las espondiloartropatías con el HLA-B27 en poblaciones caucásicas.

Enfermedad	Prevalencia aproximada del HLA-B27, %
Espondilitis anquilosante	90
Artritis reactiva	40-80
Espondiloartropatía juvenil	70
Espondiloartritis enteropática	35-75
Espondiloartritis psoriática	40-50
Espondioartropatía no diferenciada	70
Uveítis anterior aguda (iritis aguda)	50
Insuficiencia aórtica y bloqueo cardíaco	80

La prevalencia en la población general sana es del 8%.

La Tabla 1 muestra las características clínicas y paraclínicas asociadas con las SpA. Estas patologías no están asociadas con la presencia del factor reumatoideo, pero muestran una fuerte asociación con el HLA-B27, un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esta asociación varía en las diferentes formas de SpA y en los diferentes grupos étnicos, siendo más importante en la EA. Así, de esta forma, se propone que las SpA ocurren en personas predispuestas genéticamente y son desencadenadas por factores ambientales. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares del proceso inflamatorio no son del todo entendidos.

En la Tabla 2 se pueden observar los tipos de SpA más asociados con el HLA-B27 en las poblaciones caucásicas. Tanto los hombres como las mujeres se encuentran afectados, aunque la enfermedad tiene una especial predilección por el sexo masculino. Otra característica importante de las SpA, es la historia familiar positiva para este tipo de patologías. Las SpA, en general comienzan hacia los 20 años de edad, pero se pueden presentar tan temprano como en la niñez o aún en los adultos mayores. Son las responsables del 20% de los cuadros articulares crónicos en la edad pediátrica (6-10).

La evidencia epidemiológica ha demostrado que las SpA son más frecuentes de lo que previamente se pensaba. Los criterios de clasificación del Grupo de Estudio Europeo para las Espondiloartropatías, son hoy los más usados, debido a que abarcan el espectro más amplio de estas patologías. Estos criterios han sido validados en varios grupos poblacionales, y su sensibilidad y especificidad son superiores al 85% (Tabla 3) (20-30). En la Figura 1 se presenta un algoritmo sobre la probabilidad diagnóstica de SpA de acuerdo a los hallazgos clínicos, radiológicos y de laboratorio. Estudios realizados en poblaciones europeas muestran que la prevalencia de las SpA puede ser igual a la de la artritis reumatoide (Tabla 4) (31-33). A pesar de

Tabla 3. Criterios de clasificación del grupo europeo para estudio de espondiloartropatías.

- Dolor inflamatorio lumbar*, o
- Sinovitis (asimétrica, predominante en miembros inferiores) y uno de los siguientes:
- Historia familiar positiva
- Psoriasis
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Dolor en región glútea alternante
- Entensopatía

Sensibilidad 77%, especificidad 87%

Sumando:

- Sacroiliítis

Sensibilidad 86%, especificidad 87%

* Características de la lumbalgia inflamatoria sugestivos de Espondiloartropatías.

1. Comienzo de dolor lumbar antes de los 40 años de edad.
2. Comienzo insidioso.
3. Persistencia del dolor por 3 meses.
4. Dolor asociado con rigidez matutina.
5. Mejoría del dolor con el ejercicio.

El dolor tiene características inflamatorias y es sugestivo de SPA si cumple con 4 de los 5 parámetros enunciados.

Tabla 4. Estudios de prevalencia recientes de espondilitis anquilosante y espondiloartropatías relacionadas.

Grupo étnico o región	Frecuencia del HLA-B27 en la población	Prevalencia de EA en adultos, %		Prevalencia de espondilo-artropatías* en adultos, %	
		Población general	Personas HLA-B27+	Población general	Personas HLA-B27+
Esquimales(Alaska)	40	0.4		2.5	
Esquimales (Alaska y Liberia) y Chukchi	25-40		1.6	2-3.4	4.2
Sami	24	1.8	6.8		
Norte de Noruega	10-16	1.4			
Mordovia	16	0.5			
Oeste de Europa	8	0.2	2		
Alemania (Berlín)	9	0.9	6.4	1.9	13.6

EA: espondilitis anquilosante.
* Incluyendo espondilitis anquilosante.

esta alta prevalencia estimada, el comportamiento epidemiológico de la enfermedad parece variar en función del área geográfica, lo que parece explicarse por las prevalencias heterogéneas del HLA-B27 en diferentes poblaciones. Las SpA son comunes en poblaciones como los esquimales y los Inuit en Groenlandia, donde la prevalencia del HLA-B27 está entre un 25% al 40% de la población general (1,21,27). Por otra parte, las SpA son relativamente poco frecuentes en los japoneses, donde la prevalencia del HLA-B27 es menor del 1% (30).

Las formas indiferenciadas de SpA, las cuales son a menudo subdiagnosticadas, incluyen síndromes clínicos aislados, como la oligoartritis o poliartritis seronegativa asociada al HLA-B27, principalmente en miembros inferiores. Esta artritis no tiene una causa bacteriana disparadora identificable, manifestaciones clínicas extraarticulares, psoriasis o enfermedad inflamatoria intestinal asociada (1-3,8-10). Los pacientes con SpA no diferenciada pueden presentar dactilitis (dedo en salchicha) y entesitis, en particular del talón (tendón de Aquiles y

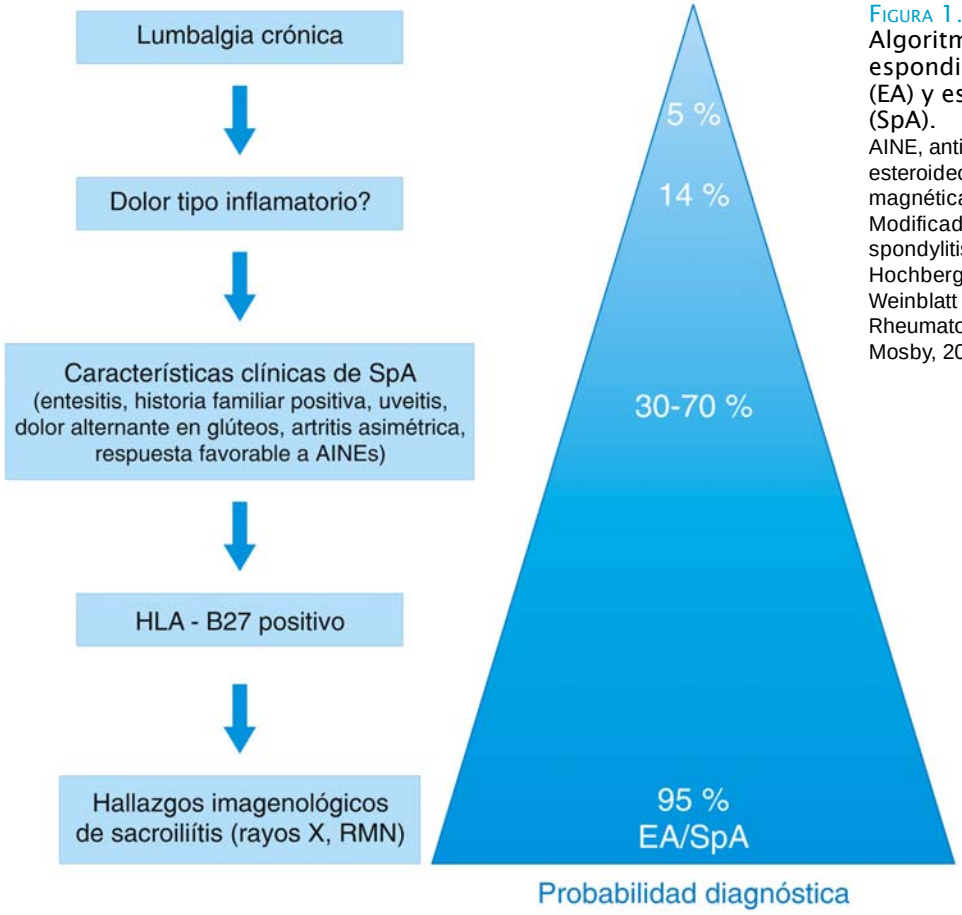


Figura 1.
Algoritmo diagnóstico para espondilitis anquilosante (EA) y espondiloartropatías (SpA).
AINE, antiinflamatorios no esteroideos; RMN, resonancia magnética nuclear.
Modificado de Ankylosing spondylitis: clinical features. In: Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M, eds. Rheumatology. 3rd ed. London: Mosby, 2002.

fascitis plantar) (10). También pueden presentar episodios de uveítis anterior aguda (iritis aguda) o tener un síndrome de insuficiencia aórtica más bloqueo cardíaco (1-3,34-39). Este síndrome cardíaco y de uveítis anterior aguda puede ocurrir sin signos de artritis y puede acompañar o preceder el comienzo de la SpA. En un estudio escandinavo, más del 88% de los pacientes sin artritis y con insuficiencia aórtica y severos trastornos en la conducción fueron positivos para el HLA-B27 (39). Casi un 50% de los pacientes con uveítis anterior aguda son positivos para el HLA-B27, y más de la mitad de los pacientes con uveítis y HLA-B27 positivos tienen alguna forma de SpA (34,35).

La evaluación rutinaria del HLA-B27 no es de ayuda clínica, debido a que las SpA pueden presentarse en la ausencia de este alelo. El HLA-B27 está presente en el 8% de las personas de raza blanca sanas, de las cuales, cerca de un 90% no desarrollarán estas enfermedades (1-4,20-22). Sin embargo, el riesgo de padecer una SpA entre las personas HLA-B27 positivas que tienen un familiar de primer grado con EA se aumenta tres veces. No existe una terapia preventiva o curativa disponible que justifique realizar la evaluación del HLA-B27 en familiares no afectados o asintomáticos.

Aunque las SpA hacen parte del diagnóstico diferencial de muchas enfermedades reumatológicas autoinmunes, y a pesar del carácter multifactorial de su patogénesis, que incluye la fuerte asociación genética con alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-principalmente el HLA-B27- y el probable papel de agentes infecciosos como desencadenantes de la enfermedad, las SpA no pueden ser consideradas enfermedades autoinmunes basados en la evidencia científica actualmente disponible.

Espondilitis anquilosante

La EA es una enfermedad inflamatoria crónica asociada al HLA-B27 pero de etiología desconocida. El término EA proviene del griego a*nkylos* (fusión o adhesión) y *spondylos* (vértebras). No obstante, algunos autores consideran que espondilitis o enfermedad espondilítica sería un término más correcto para denominar esta entidad, debido a que una franca anquílosis de la columna vertebral se presenta sólo en estados tardíos de la misma y no ocurre en muchos pacientes con enfermedad leve. La EA afecta principalmente articulaciones sacroilíacas y el esqueleto axial, aunque el compromiso articular periférico puede ocurrir. Las manifestaciones extraesqueléticas incluyen, entre otras, uveítis anterior aguda, insuficiencia aórtica, compromiso neurológico y amiloidosis renal secundaria.

Estudios paleontológicos en momias egipcias sugieren que la EA ha afectado a la humanidad desde la antigüedad. Sin embargo, la primera evidencia histórica de EA data del año 1559 cuando Realdo Colombo describió dos esqueletos con anormalidades características de EA en su libro *De Re Anatomica*. La historia moderna comienza a mediados del siglo XIX con Brodie, quien describió las características clínicas de un hombre de 31 años que tenía una anquilosis espinal y quien "ocasionalmente sufría de inflamación severa del ojo". En 1884, Struempell describió a 2 pacientes alemanes con anquilosis vertebral completa y compromiso de la cadera. Luego de la aparición de la técnica de rayos X en 1896, se comenzaron a describir las correlaciones clínicas y radiológicas de los pacientes con EA. El tratamiento de la EA inicialmente incluyó uso de vacunas (tifoidea) y radioterapia de manera empírica. Luego, con el advenimiento de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y más recientemente con el uso de terapias biológicas (ver adelante) contra mediadores inflamatorios responsables del daño tisular se ha podido brindar un manejo más apropiado –aunque todavía empírico- para estos pacientes.

Epidemiología

La EA es una enfermedad compleja y debilitante, con una prevalencia que alcanza el 0.9% de la población mundial. De hecho, la prevalencia de la EA puede ser tan baja como en la población japonesa, que se ha estimado en 9.5 casos por cada 100.000 habitantes, donde menos de un 1% de la población general posee HLA-B27, y a la vez puede ser tan alta como en países nórdicos, donde se calcula que 1 de cada 200 sujetos caucásicos es afectado por la enfermedad y la prevalencia del HLA-B27 es del 16% (30). La incidencia varía, según los diferentes estudios, entre 7.3 y 8.9 casos por 100.000 habitantes por año en personas mayores de 16 años. No obstante, en latinoamérica son pocos los datos epidemiológicos al respecto. Los factores de riesgo que predisponen a la EA incluyen: seropositividad para el HLA-B27, historia familiar de EA, sexo masculino e infecciones gastrointestinales recurrentes.

Histopatología

La entesitis, definida como los cambios inflamatorios en los sitios de inserción de tendones, cápsulas, ligamentos o fascias en los huesos, es considerada como el más importante hallazgo en la EA. La entesis es el principal blanco de la respuesta inmune y el sitio primario de la inmunopatología. Los cambios relacionados con la entesitis explican los hallazgos característicos de la EA a los rayos X, como los sindesmofitos, apariencia cuadriculada de los cuerpos vertebrales y destrucción de la placa terminal vertebral.

Manifestaciones clínicas

Las primeras manifestaciones de la enfermedad suelen aparecer entre la segunda o tercera décadas de la vida, aunque existe un subtipo de EA de aparición más temprana (EA juvenil). Es muy raro que la enfermedad comience después de los 45 años de edad, pero puede ser diagnosticada en muchos pacientes a esta edad; en parte, porque los síntomas durante años han sido mínimos (8-10,41). Los hombres se afectan dos o tres veces más que

las mujeres. El patrón de la enfermedad parece variar en función del género (1-4,40). La columna vertebral y pelvis están más afectadas en los hombres, con algún compromiso de la pared torácica, cadera, hombros y pies. En contraste, las mujeres tienen en general más síntomas en rodillas, muñecas, tobillos, caderas y pelvis. La enfermedad tiende a ser más severa en los hombres.

El diagnóstico de la EA es clínico, pero las manifestaciones clásicas de dolor lumbar inflamatorio crónico (comienzo insidioso antes de los 45 años de edad, empeoramiento con la inactividad, y mejoría con el ejercicio) no son muy específicas (Tabla 3) (42). Una historia de uveítis anterior aguda, una historia positiva familiar de EA u otras SpA, o disminución de la movilidad de la columna o expansión torácica soportan más el diagnóstico (1-3,26, 35,40,43). Otros indicadores clínicos son la presencia de entesitis, con el dolor resultante a nivel de las articulaciones sacroilíacas y la columna y ocasionalmente en otros sitios como en el talón, cresta iliaca, y pared torácica anterior (26,44,45).

Aunque el principal compromiso articular involucra el esqueleto axial, se puede presentar compromiso en grupos articulares periféricos. Las articulaciones comprometidas en algunos pacientes son las caderas y los hombros, manifestándose como artritis hasta en un 30% de los pacientes. Este compromiso puede darse en las fases iniciales de la enfermedad e incluso ser su primera manifestación. La afección de la cadera tiende a ser más severa que la de los hombros. El compromiso asimétrico de otras articulaciones de predominio en miembros inferiores puede presentarse en cualquier fase de la enfermedad.

Los criterios de Nueva York modificados son actualmente los más utilizados para la clasificación de la enfermedad (Tabla 5) (46).

El diagnóstico clínico está soportado por la evidencia radiológica de sacroiliítis, la cual es considerada como el marcador de la EA. La radiografía anteroposterior de la pelvis es usualmente suficiente para evaluar el compromiso sacroiliaco (Figura 2). Sin embargo, en algunos pacientes en quienes la sospecha clínica de enfermedad temprana es alta pero la radiografía convencional de las articulaciones sacroilíacas es normal o muestra cambios dudosos, las imágenes con resonancia magnética, en especial con refuerzo de gadolinio, generan una evidencia excelente de sacroiliítis y entesitis (14,47,48). Estas imágenes de resonancia magnética son de gran valor en los niños y adolescentes (6,48). Sin embargo, la mayor desventaja de este método es su alto costo.

Debido al carácter insidioso y recidivante de la enfermedad, su diagnóstico generalmente es tardío. Estos pacientes usualmente han consultado a varios centros médicos y con frecuencia múltiples exámenes médicos innecesarios les han sido practicados antes de llegar a un diagnóstico definitivo (8,9,49-51). Dentro de los exámenes paraclínicos, una velocidad de sedimentación normal no descarta el diagnóstico (52).

Algunos pacientes presentan síntomas constitucionales leves, como fatiga, pérdida del apetito o febrícula en los estadios tempranos de la enfermedad. La manifestación extraesquelética más común es la uveítis aguda anterior o irido-ciclitis. Esta manifestación ocurre entre un 25 al 30% de los pacientes. Se presenta típicamente de inicio unilateral, con dolor, fotofobia y lagrimación excesiva. Presenta signos de ojo rojo y disminución de la agudeza visual. La uveítis tiende a recurrir, algunas veces en el ojo contralateral. De no ser tratada, los episodios agudos de uveítis se resuelven con la posible formación de sinequias. Esta manifestación ocurre de forma predominante en los pacientes con EA y HLA-B27 (1-4,53).

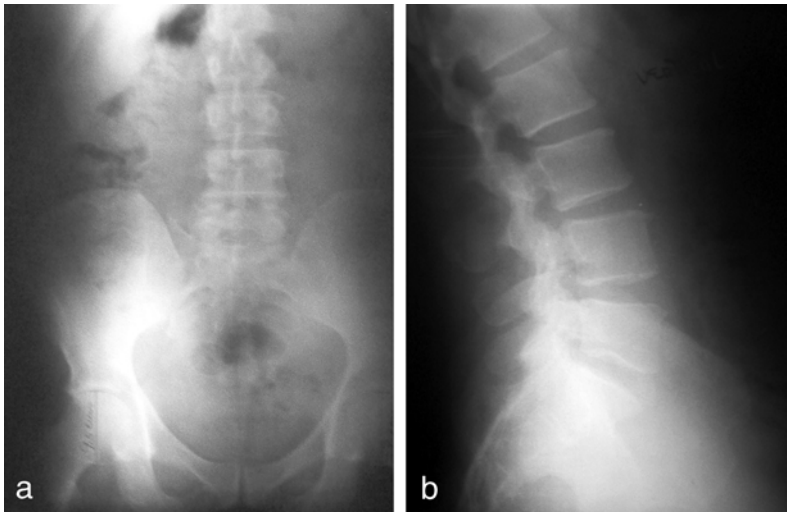
Tabla 5. Criterios de New York modificados para espondilitis anquilosante, 1984.

1. Dolor lumbar de 3 meses de duración que mejora con el ejercicio y no con el reposo.
2. Limitación de la columna lumbar en planos sagital y frontal.
3. Expansión torácica limitada de acuerdo con los valores normales para edad y sexo.
4. Sacroiliítis bilateral grados 2-4.
5. Sacroiliítis unilateral grado 3-4

Se clasifica como EA, si el paciente presenta sacroiliítis unilateral grado 3-4 o bilateral 2-4 más cualquier otro criterio.

Figura 2.

a. Rayos X antero posterior de pelvis de un paciente con EA, que muestran sacroiliítis con marcado compromiso en articulaciones sacroiliacas simétrico, con la presencia de erosiones y esclerosis del hueso subyacente. Los cambios tienden a ser más marcados en el lado iliaco de la articulación, debido a la presencia de un cartílago más delgado en este lado. b. Rayos X laterales de columna lumbar que muestran sindesmofitos, los cuales llevan a cambios en las vértebras, tomando éstas una forma cuadrada. Estos cambios hacen que la columna tome una forma característica en fases tardías de la enfermedad, denominada columna de bambú.



El corazón también puede afectarse en esta patología. Las manifestaciones cardíacas incluyen aortitis ascendente, insuficiencia valvular aórtica, trastornos en la conducción cardíaca, cardiomegalia y pericarditis. Estas manifestaciones son poco comunes, pero su frecuencia aumenta con la duración de la enfermedad, llegándose a presentar insuficiencia aórtica hasta en un 10% de los enfermos luego de 30 años de enfermedad (36-39).

El compromiso pulmonar es una manifestación tardía. Se caracteriza por fibrosis pulmonar lenta y progresiva de los lóbulos superiores, relacionada, al igual que la anterior complicación, con la duración de la enfermedad. Las lesiones pueden volverse quísticas y estas cavidades pueden colonizarse por *Aspergillus.* Generalmente la ventilación está conservada, por mecanismos compensatorios.

Cambios renales pueden presentarse también en estos pacientes, por depósito de amiloide secundario al proceso inflamatorio crónico (amiloidosis renal). En otros casos puede ser debido a nefropatía por IgA. De hecho, es frecuente que los pacientes con EA presenten niveles elevados de IgA dentro de los parámetros de laboratorio. También se encuentra hematuria y proteinuria hasta en un 35% de los casos.

Una de las manifestaciones posibles en pacientes con EA, es la disminución de la densidad mineral ósea, y osteoporosis, con las posibles secuelas derivadas de ésta, como fracturas vertebrales, fracturas de cadera, deformidades y dolor. Las fracturas producidas son principalmente de vértebras torácicas. Entre los factores que contribuyen al aumento en el riesgo de fracturas se encuentran la inflamación crónica y la movilidad disminuida (54-56). La medición adecuada de la densidad mineral ósea es difícil por la presencia de sindesmofitos en la columna, que producen una lectura falsamente alta. Este error puede evitarse usando la tomografía cuantitativa o la medición en la cadera de la densidad mineral ósea.

El sistema nervioso puede afectarse por fracturas, inestabilidad, inflamación o compresión de las estructuras vertebrales. Los niveles cervicales C5-C6 y C6-C7 son los más comprometidos (57-60). Puede ocurrir también subluxación atlantoaxoidea al igual que en los pacientes con artritis reumatoide. El síndrome de la cauda equina es una complicación rara pero muy seria de la enfermedad. Se debe a un compromiso de las raíces nerviosas lumbosacras, que producen una pérdida sensitiva y trastornos en el control de esfínteres.

En la mayoría de los pacientes la enfermedad sigue un curso benigno, aunque su patrón de progresión es variable. No obstante, los pacientes con EA tienen una expectativa de vida reducida; la mortalidad en estos pacientes aumenta 1.5 a 4 veces comparada con la de la población general. La principal complicación encontrada es la fractura vertebral. Debido a su alta prevalencia, la EA genera un gran impacto económico y social.

Tabla 6. Lista de los agentes artritogénicos implicados en el desarrollo de artritis reactiva.

Agentes clásicos
Clamyidia trachomatis
Ureaplama urealyticum
Yersinia enterocolitica y Pseudotuberculosis
Shigella flexneri y sonnei
Salmonella typhimurium, enteritidis y otras
Campylobacter jejuni
Streptococcus sp
Agentes nuevos
Clamidia pneumonie
Mycoplasma hominis y fermentans
Neisseria gonorrhoeae
Borrelia burgdorferi
Clostridium difficile
Estreptococo beta hemolítico
Propionibacterium acnes
Escherichia coli
Helicobacter pylori
Bacillus cereus
Pseudomonas
Hafnia alvei
Brucella abortus
Bacilo de Calmette-Guerin
Leptospira
Bartonella
Trophyrema whippelii
Gardnerella vaginales
Giardia lamblia

Artritis reactiva

La artritis reactiva (ARe) corresponde a un episodio de artritis periférica aséptica que ocurre generalmente un mes posterior a una infección primaria en otro sitio del cuerpo, usualmente una infección genitourinaria por *Clamidia trachomatis* o gastrointestinal debido a enterobacterias gram-negativas, como *Shigella*, *Salmonella, Yersinia* o *Campilobacter* (Tabla 6) (61-66). También se puede presentar luego de la inyección del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) en la vejiga para el tratamiento del cáncer (67,68); pero no se ha reportado secundario al uso del bacilo para la prevención de la tuberculosis. Se ha sugerido que infecciones del tracto respiratorio por *Clamidia pneumonie* pueden desencadenar ARe, pero la evidencia no es concluyente (69). En la Tabla 6 se presentan los gérmenes más implicados en el desarrollo de la ARe.

El porcentaje de individuos que desarrollarán una ARe después de un episodio infeccioso varía de acuerdo al germen implicado, la carga genética del individuo y, probablemente, a factores ambientales. En infecciones causadas por enterobacterias la frecuencia puede variar desde 0 al 15%, sin importar el hecho de que la mayoría de estos pacientes sean HLA-B27 positivos. La incidencia de ARe posterior a una infección por *Clamidia* es desconocida (70). La tasa de ARe asociada a *Clamidia trachomatis* es casi la misma que la causada por todas las enterobacterias juntas. Por otro lado, mientras que la ARe postentérica es descrita en igual frecuencia en los hombres y en las mujeres, la ARe asociada a *Clamidia* es más reportada en los hombres (71).

La infección del tracto genito-urinario por *Clamidia trachomatis* es el factor disparador más reconocido como desencadenante de ARe en países desarrollados, mientras que las infecciones gastrointestinales por enterobacterias son los factores más reconocidos en las áreas del mundo en desarrollo. La uretritis y la cervicitis pueden acompañar a la artritis después de una diarrea bacteriana aguda. Por otra parte, las lesiones de apariencia psoriasiforme, presentes en los genitales externos (balanitis circinada y vulvitis circinada) pueden ocurrir en ausencia de infección genitourinaria. En cerca de un 25% de los casos, un agente desencadenante del cuadro es desconocido.

La ARe es típicamente un cuadro agudo, asimétrico y oligoarticular, asociado de forma frecuente con una o más manifestaciones extraarticulares características, como inflamación ocular (conjuntivitis o iritis aguda), entesitis (tendinitis aquileana y fascitis plantar), dactilitis ("dedos en salchicha"), lesiones mucocutáneas, uretritis, y en raras ocasiones, carditis (61-66). La conjuntivitis ocurre en un tercio de los pacientes con ARe, usualmente al mismo tiempo de aparición del cuadro articular, y la presencia de uveítis anterior aguda, puede ser concomitante con el compromiso articular en un 5% de los pacientes. La triada de artritis, conjuntivitis y uretritis ha sido denominada clásicamente como síndrome de Reiter, pero la mayoría de los pacientes con ARe no presentan esta triada (61).

La duración promedio de la artritis es de 4 a 5 meses, pero incluso hasta dos terceras partes de los pacientes presentan síntomas músculoesqueléticos que persisten por más de un año (61,62,72). Las recurrencias son más comunes en los pacientes con ARe inducida por *Clamidia*. Aproximadamente un 15% al 30% de los pacientes desarrollan una artropatía crónica o recurrente, sacroiliítis o espondilitis, y la mayoría de estos pacientes poseen una historia familiar positiva para SpA o son HLA-B27 positivos (61-63). En las Tablas 7 y 8 se presentan las principales diferencias clínicas en pacientes con ARe de acuerdo con el marcador genético HLA-B27 y los criterios clasificatorios de ARe, respectivamente (73,74).

Algunos cuadros articulares que semejan la forma clásica de ARe, artritis psoriática, o SpA no diferenciadas pueden suceder en algunos pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (75,76), pero estas condiciones tienden a ser menos comunes en países desarrollados, desde la aparición de mejores y más efectivas terapias antirretrovirales. Desde el advenimiento de la epidemia actual de la infección por el VIH, la ARe, la psoriasis, la artritis psoriática, y SpA relacionadas, excepto la EA, se han presentado de forma más frecuente en

Tabla 8. Criterios clasificatorios de ARe* propuestos por Pacheco-Tena et al.

1. ARe probable:
   a. Síntomas musculoesqueléticos** más enfermedad extraarticular***
   b. Manifestaciones clínicas de enfermedad infecciosa +, pero sin identificación bacteriana precediendo los síntomas musculoesqueléticos** por 4 a 6 semanas.
2. ARe definitiva disparada por bacterias:
   a. Identificación bacteriana/ de una enfermedad infecciosa precediendo los síntomas musculo-esqueléticos**
   b. Identificación bacteriana// en un episodio de reciente comienzo (4 a 6 semanas) de síntomas musculo-esqueléticos**
3. Oligoartritis o espondiloartropatía indiferenciada asociada a bacterias.

** Artritis, oligoartritis, poliartritis o artropatía.
*** Mucositis (conjuntivitis, uretritis y cervicitis) o alguna manifestación extraarticular (queratodermia blenorrágica, balanitis circinada y uveítis)
\+ Diarrea o uretritis
/ Cultivo positivo en el sitio de la infección y/o anticuerpos antibacterianos séricos
// Cultivo positivo en el sitio de infección, anticuerpos antibacterianos séricos, proliferación en linfocitos sinoviales o sangre periférica, y/o antígenos bacterianos en tejido por inmunofluorescencia o líquido sinovial o detección de DNA o RNA.
Referencia 74.

Tabla 7. Características de la ARe en función de HLA-B27.

Manifestaciones	ARe no asociada a HLA-B27 *	ARe asociada a HLA-B27+
Disparadores	Una variedad de agentes mayor que en la asociada a HLA-B27	*Campilobacter, Clostridium difficile, Salmonella, Shigella, Yersinia, Clamidia*
Estructuras microbianas en la articulación	Rara vez	Sí
Microorganismos cultivables	No	Sí
Diagnóstico diferencial de artritis bacteriana	A menudo incierto	La mayoría es claro
Oligo o poliartritis	Poliartritis más común	Oligoartritits más común Usualmente en rodillas
Síndrome de Reiter	No usual, pero puede encontrarse luego de infecciones genitourinarias	Ocurre
Tendencia a cronicidad	No claro	Sí
Evolución a espondilitis anquilosante	No observada	Posible
Parte del grupo de espondiloartropatías	No	Sí
Mecanismo patogénico	Similar a la artritis antígeno-inducida experimentalmente	Similar asociado a mecanismos HLA-B27

* En pacientes con esta forma de ARe, HLA-B27 ocurre en la misma frecuencia que en la población general.
\+ 60 a 90% de los pacientes con esta forma de ARe son HLA-B27 positivos.
Adaptado de referencia 73.

países del África sub-sahariana. Por ejemplo, la prevalencia de SpA en Lusaka, Zambia, es calculada en 180 casos por 100.000 personas infectadas por el VIH, una proporción 12 veces mayor que la presencia en la población no infectada por el virus (73). Sin embargo, no es claro aun si esta asociación se debe al VIH *per se*, a la presencia de infecciones oportunistas o a los trastornos inmunológicos descritos en estos pacientes.

Artritis psoriática

La psoriasis es una enfermedad crónica, inflamatoria de la piel caracterizada por xerodermia, lesiones eritematosas y descamativas. Es frecuente en la población blanca (prevalencia del 1 al 3%) y es más común en la región norte de Noruega y Rusia (5 al 10%). Es poco frecuente en otros grupos étnicos, como las personas negras y los nativos americanos (0 al 0.3%) (77). Afecta por igual a los hombres y las mujeres. Más del 10% de los pacientes con psoriasis tienen una artritis inflamatoria asociada, incluyendo sacroiliítis y espondilitis (77). La psoriasis usualmente precede la aparición de la artritis. La artritis se inicia entre los 30 y 50 años de edad, pero ésta también puede iniciarse en la niñez, y hasta en el 15% de los pacientes puede preceder al comienzo o al diagnóstico de psoriasis.

La psoriasis tiene muchos tipos como la guttata, pustular o en placas, y puede o no estar asociada con cicatrices ungüeales, distrofia u onicolisis. Las lesiones psoriáticas de las mucosas pueden estar localizadas en la mucosa yugal, la lengua y los genitales. La psoriasis tipo 1, tiende a ser familiar, con un inicio temprano de la enfermedad (<40 años) y tiene una gran asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La psoriasis tipo 2, tiene un comienzo más tardío y tiende a ser no familiar (77).

Moll y Wright (78) definieron la artritis psoriática como una "artritis inflamatoria asociada con psoriasis, que usualmente es negativa para el factor reumatoideo" y propusieron diferentes subtipos: monoartritis y oligoartritis, poliartritis, artritis de las articulaciones interfalángicas distales con cambios en las uñas, artritis mutilante y espondilitis. Sin embargo, la diferenciación de estos subtipos es hoy en día poco evidente, y no existen criterios internacionalmente aceptados para el diagnóstico de la artritis psoriática (77). La búsqueda de lesiones de psoriasis no se debe limitar a las extremidades y, sitios como el cuero cabelludo, las orejas, el ombligo, el área pélvica, el perineo, el área perianal, las palmas, las plantas y las uñas, también deben ser examinados. El compromiso ungüeal es una clave útil para el diagnóstico de esta enfermedad.

La psoriasis con evolución moderada, con un patrón eritrodérmico generalizado y asociada con recaídas de artritis debe alertar al clínico a descartar la coinfección por el VIH. La incidencia de psoriasis y artritis psoriática se ha incrementado dramáticamente en África sub-sahariana por la epidemia actual de la infección por el VIH (73,74, 77). De 702 pacientes con artritis inflamatoria en Zambia, 28 tenían artritis psoriática y todos, menos uno, eran positivos para VIH (73). Este hallazgo podría sugerir que a cada paciente con diagnóstico reciente de artritis psoriática en dicha población y, probablemente, en todas debe descartársele una posible infección por el VIH.

Artritis enteropática

El término artritis enteropática describe la ocurrencia de artritis inflamatorias en pacientes con colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn. Este desorden es más frecuente de lo previamente reportado: 39% de 103 pacientes consecutivos con colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, a pesar de la extensión del compromiso intestinal, tenían artritis enteropática, y más del 90% cumplían los criterios clasificatorios de espondiloartropatía (79). De manera adicional un 18% de los pacientes tenían sacroiliítis asintomática. La sacroiliítis, sin importar si era sintomática o no, se relacionó con la duración de la enfermedad. La manifestación de dolor lumbar inflamatorio estuvo presente en el 30% de los 103 pacientes, 10% tenían sinovitis, 7% entesitis periférica y 10% cumplieron los criterios para EA.

La artritis de las articulaciones periféricas en los miembros, tiende a ocurrir mucho más frecuente en la artritis enteropática que en la EA primaria, pero ésta es usualmente autolimitada y no deformante. Cerca de un cuarto de los pacientes con artritis enteropática tiene compromiso axial (sacroiliítis con o sin hallazgos clínicos y radiográficos de EA) que no fluctúa con la actividad de la enfermedad intestinal (79-81). Al contrario, un aumento en la frecuencia de lesiones inflamatorias subclínicas del intestino (20% al 70%) se observa en la biopsia de la mucosa colónica en pacientes con SpA sin síntomas gastrointestinales o enfermedad intestinal inflamatoria clínica. Estudios de seguimiento de estos pacientes indican que el 6% desarrollarán enfermedad intestinal inflamatoria y, de aquellos con lesiones histológicas inflamatorias crónicas del colon el 15% al 25% desarrollarán enfermedad de Crohn evidente a la clínica. Esto sugiere que este último grupo de pacientes, inicialmente cuando se presentaban con artritis, tenían una forma subclínica de enfermedad de Crohn (81).

Patogénesis

Las SpA son enfermedades multifactoriales, que ocurren en individuos genéticamente predispuestos y son disparadas por factores ambientales (66). Los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación, todavía no son totalmente entendidos. De manera característica, se observa en los sitios de inflamación un incremento en el número de las células T y macrófagos, y una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias (interleuquina-1β, factor de necrosis tumoral-α e interferón-γ) (82). El proceso inflamatorio de manera gradual causa erosiones en el hueso cortical y osteogénesis, pero también en algunos pacientes puede causar la pérdida substancial de masa ósea en estadios tempranos de una enfermedad activa (54,55). A diferencia de la artritis reumatoidea, en la cual la sinovitis es la lesión primaria o inicial, la sinovitis en las SpA es un

evento secundario que ocurre después de la entesitis, al menos en algunas articulaciones (83).

No existe evidencia definitiva de un agente infeccioso como disparador de la EA, pese a las afirmaciones persistentes de un grupo durante los pasados 25 años que la *Klebsiella pneumonie* en el intestino era un desencadenante de la enfermedad (84). El iniciador bacteriano de la artritis reactiva postinfecciosa (Tabla 6), comparte la característica de ser invasor de la superficie de la mucosa y capaz de replicarse intracelularmente. La *Clamidia* es un patógeno intracelular obligado que primariamente reside en las células epiteliales pero puede infectar otro tipo de células, como por ejemplo los macrófagos que podrían servir como un reservorio de la infección latente (64).

Las SpA parecen tener una patogénesis mediada por el sistema inmune. La hipótesis del péptido artritogénico sugiere que la artritis es disparada por la respuesta de las células T a péptidos antigénicos específicos derivados de una bacteria desencadenante, y que luego, estas células T tienen una reacción cruzada con péptidos derivados de autoantígenos (16-19,66,85-90). Una expansión oligoclonal incrementada de células T CD8+ se ha observado en las articulaciones comprometidas de algunos pacientes con SpA; el tipo de antígeno, propio o infeccioso, responsable de esta expansión está siendo investigado (12, 66, 87-91).

Los componentes antigénicos microbianos o las bacterias no replicativas pueden alcanzar los ganglios linfáticos regionales o ser transportados por los macrófagos a las articulaciones o a otros sitios de inflamación. Ellos se han encontrado en la sinovia o en el líquido sinovial de algunos pacientes con ARe, y pueden persistir en la articulación e iniciar una respuesta inmune local. Sin embargo, a pesar de muchos esfuerzos, ningún organismo se ha podido cultivar de las articulaciones inflamadas de los pacientes con SpA. La *Clamidia* tiene propiedades biológicas poco usuales en el tejido o líquido sinovial, lo cual podría explicar porque los cultivos de material de la sinovia son negativos para C. *trachomatis* (64).

Los proteoglicanos del cartílago y la proteína de unión están siendo estudiados como posibles autoantígenos en la EA y las SpA relacionadas. Estas sustancias comparten una homología molecular considerable e inducen una artritis semejante a la SpA en el ratón BALB/c (89).

Una asociación potencial entre la artritis psoriática y un trauma en los 3 meses previos a la enfermedad se ha reportado, pero sólo en un 8% al 9% de los pacientes, (comparados con el 1% al 2% de los controles con artritis reumatoidea) han presentado este antecedente. Este efecto puede resultar del stress psicológico más que del trauma físico directo de la articulación, aunque el fenómeno de Koebner, una característica cutánea de la psoriasis, puede también ocurrir en las articulaciones periféricas (fenómeno de Koebner profundo) (91).

Aspectos genéticos

Estudios en gemelos y familias sugieren que pocos genes están involucrados en determinar la susceptibilidad para las SpA (66,92-97). Combinaciones de tales genes y de factores ambientales pueden predisponer a una variación en la expresión de la enfermedad, y los diferentes grupos de alelos de susceptibilidad de distintos loci pueden producir el mismo fenotipo de la enfermedad, dando lugar a una clasificación clínica errónea. Es más, no todos los individuos con un grupo de alelos de susceptibilidad desarrollarán la enfermedad (esto es, penetrancia variable).

Estudios recientes han confirmado que el HLA-B27 es la contribución genética más fuerte para desarrollar SpA y los hallazgos soportan el papel de otros genes adicionales (66,92,93,96,97) que también pueden incluir genes de susceptibilidad para psoriasis y enfermedad intestinal inflamatoria (98-101). Uno de los genes candidatos para la psoriasis, PSORS1, está ubicado en un fragmento telomérico de 60-kb del locus HLA-C en el cromosoma 6p (101). Un gen específico de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn, NOD2, ha sido identificado en la región peri-centromérica (16q12) del cromosoma 16 (98-100). La proteína codificada por este gen activa al factor nuclear (NF)-κβ en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos. Una mutación en el marco de lectura del gen NOD2 causada por la inserción de una citosina, confiere un incremento substancial en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn. NOD2, en su forma no mutada, activa el NF- κβ. Estos hallazgos implican al NOD2 en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn y sugieren una relación entre la respuesta inmune innata a componentes bacterianos y el desarrollo de la enfermedad (98-100).

La evidencia favorece el rol del HLA-B27 en el aumento de la susceptibilidad genética, pero las vías moleculares por las cuales actúa son aún desconocidas (66,92-95). El HLA-B27 puede jugar un papel en la presentación de los péptidos artritogénicos a las células T, o puede tener una biología celular inusual (comparado con las otras moléculas HLA clase I) que tenga un rol patogénico (Figura 3) (19,85,102-104). Por ejemplo, la molécula HLA-B27 puede existir en una manera aberrante (cadenas pesadas libres formando homodímeros estables que carecen de β2-microglobulinas) (19), y éste tiene una tendencia incrementada de un plegamiento anormal en el retículo endoplásmico (103). Sin embargo, ninguna hipótesis explica completamente el papel patogénico del HLA-B27 (66).

Ratones transgénicos para HLA-B27 espontáneamente desarrollan una enfermedad inflamatoria semejante a las SpA humanas. Para el desarrollo de ésta enfermedad inflamatoria, se requiere de componentes bacterianos y de un aumento en la expresión de HLA-B27 por las células T y las células presentadoras de antígenos (85,86). La inflamación intestinal y la diarrea que precede a la artritis requieren la presencia de flora intestinal viva normal. Un aumento en la frecuencia de lesiones intestinales inflamatorias subclínicas en los pacientes con SpA, y la asociación conocida entre enfermedad intestinal inflamatoria y SpA, soportan una relación en la patogénesis de la infla-

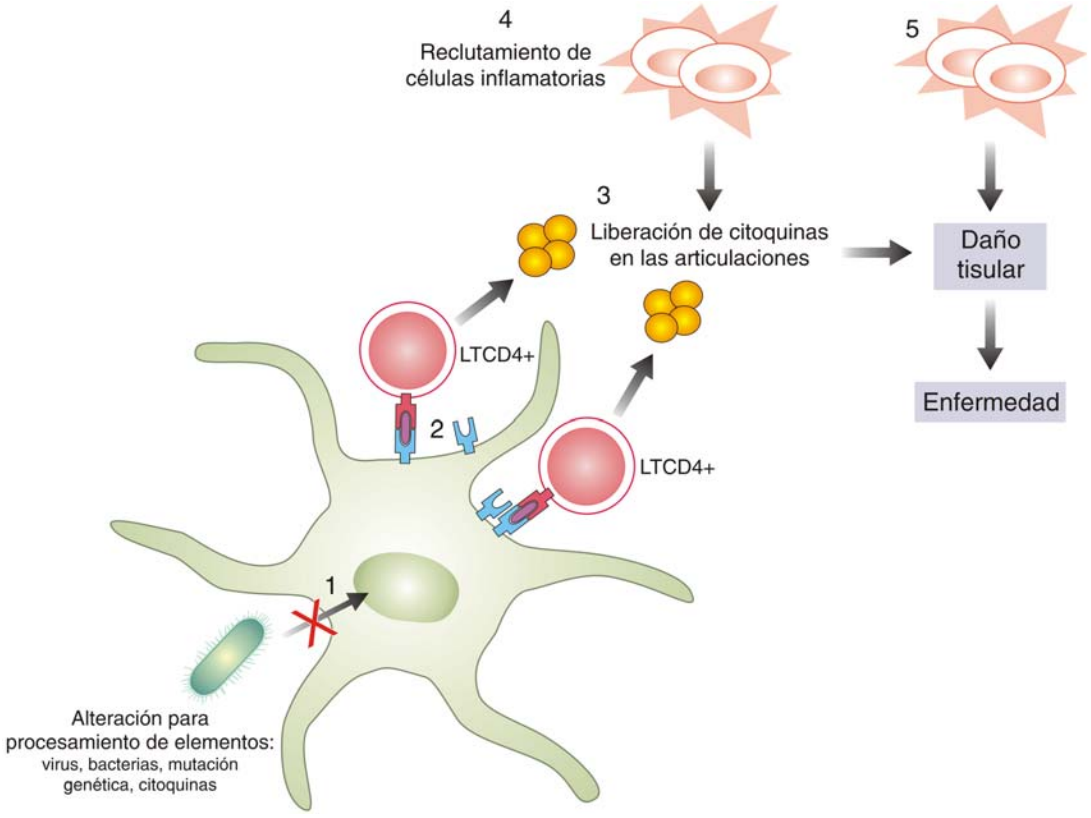


FIGURA 3.
Modelo del papel de células T CD4+ HLA-B27 en las espondiloartropatías.
Alteraciones en las vías de procesamiento de moléculas del MHC Clase I, por ejemplo por infecciones virales o bacterianas, mutaciones genéticas o patrones de citoquinas alterados (1), pueden llevar a una expresión alterada del HLA-B27 *in vivo*. Formas inusuales, incluyendo heterodímeros de HLA-B27 vacíos y complejos de HLA-B27 mal plegados como homodímeros, pueden ser reconocidos por células T CD4+ HLA-B27 específicas (2). Esto puede llevar a la proliferación de células T CD4 y a la liberación de citoquinas (3), que atraerían células inflamatorias como macrófagos y células NK al sitio de la enfermedad (4). La liberación de citoquinas por las células inflamatorias resulta en daño tisular y un futuro reclutamiento mayor de células (5). Referencia 103.

mación intestinal y las SpA, que es independiente de HLA-B27 (66,80,81).

El HLA-B27 es un alelo del CMH clase I- implicado en la presentación antigénica a células T CD8+ o citotóxicas- del cuál se han descrito 25 variantes (HLA-B*2701 al HLA-B*2725), también conocidos como subtipos del HLA-B27 (93,105). El HLA-B*2705 se ha observado como el más común. La ocurrencia de EA o de otras SpA relacionadas se ha observado en pacientes con distintos subtipos. Sin embargo, el HLA-B*2706 en el sureste de Asia y el HLA-B*2709 en Sardinia parecen no estar asociados con la EA, aunque raros casos de ocurrencia de SpA han sido reportados (88,93,105-108). Los dos subtipos que más se han visto asociados con la enfermedad en pacientes blancos, son el HLA-B*2705 y el HLA-B*2702.

Tratamiento

El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) a dosis terapéuticas totales durante las fases activas de la enfermedad y un programa de ejercicios regulares apropiados, incluyendo la natación, son la base para el manejo de la EA y para todo el grupo de SpA en general (1-3, 109-111). Debido a la respuesta terapéutica variable a los AINE de un paciente a otro, la falta de eficacia con un miembro de esta familia no descarta el uso de otro. Por otro lado, es importante utilizar las dosis óptimas del medicamento para alcanzar el efecto antiinflamatorio y no puramente analgésico. Los nuevos AINE con mayor selectividad sobre la cicloxigenasa tipo 2 (COX2), no ofrecen ninguna ventaja terapéutica sobre los AINE clásicos, aunque sí tienen un mejor perfil de efectos secundarios. Sesiones formales de terapia física en grupo, hidroterapia y el estiramiento pasivo de las articulaciones, son por lo general subutilizadas. Pocos estudios aleatorizados y controlados han demostrado el beneficio de estas terapias en el aumento del rango de movimiento y en la mejoría de las posturas o disminución de la deformidad (112-115).

El uso de apoyos, tablillas y corsés no es útil y deben por tanto, ser evitados. Consejos apropiados y modificaciones del estilo de vida incluyen el abandono del cigarrillo, la vacunación anual contra la influenza, evitar las lesiones físicas y las caídas, modificaciones del trabajo y del sitio de trabajo. La educación en salud y los consejos a los pacientes con artritis crónica, añaden beneficios substanciales y sostenidos a la terapia convencional y reducen los costos (116-118), y los programas educativos de autoayuda son bien aceptados por los pacientes y mejoran el comportamiento y pronóstico del estado de salud.

Las inyecciones locales de corticoesteroides en articulaciones periféricas con entesitis y sinovitis persistentes, pueden ser útiles. Además, la sulfasalazina para el control de la artritis periférica, el tratamiento de la psoriasis o de la enfermedad intestinal inflamatoria, puede ser utilizada en pacientes que no respondan o no toleren adecuadamente los AINE (109).

El metotrexate puede ser utilizado para el manejo de pacientes con sinovitis persistentes de las articulaciones periféricas, pero el primer estudio aleatorizado, controlado de EA severa, no demostró algún beneficio significativo de este medicamento comparado con placebo, aún en pacientes con artritis periférica (119). La amitriptilina a dosis de hasta 30mg en la noche, puede mejorar el patrón de sueño mejorando las sintomatología nocturna (120).

Los antibióticos no son efectivos (121-124), aunque, en un estudio (125) se reportó mejoría parcial de una ARe persistente inducida por *Clamidia*, con un tratamiento prolongado (>3 meses) con tetraciclina. Es más, un tratamiento efectivo y oportuno de las infecciones por *Clamidia* disminuyó el riesgo de ARe adquirida sexualmente en una población Inuit de Groenlandia, que tiene una alta prevalencia tanto del HLA-B27 como de infecciones por *Clamidia* (126).

Eficacia de terapias anti-factor de necrosis tumoral-α y otras nuevas terapias

Los pacientes con EA, artritis psoriática o artritis enteropática que no responden a la terapia convencional han recibido medicamentos dirigidos contra el factor de necrosis tumoral-α (anti-TNF-α) como el infliximab (Remicade) o el Etanercept (Enbrel). Este tratamiento mejora pronto la artritis periférica, entesitis y los signos y síntomas axiales (127-133). Estudios controlados, doble ciegos, aleatorizados y abiertos de infliximab intravenoso a una dosis de 5 mg/kg en tres ocasiones (semana 0, 2 y 6) y luego cada 8 semanas, han demostrado una respuesta terapéutica pronta y una mejoría significativa estadísticamente en la mayoría de los pacientes con EA (127-130, 134, 135).

La mayor eficacia del etanercept (25 mg subcutáneos dos veces por semana) en pacientes con psoriasis severa y artritis psoriática, fue reportada en un estudio controlado, doble ciego y aleatorizado (131). Esta terapia substancialmente disminuyó el uso de metotrexate y corticoesteroides en estos pacientes. El etanercept también es muy efectivo en niños con artritis juvenil, incluyendo las SpA juveniles (133). Un estudio controlado con etanercept en EA también demostró eficacia importante (136).

Como en la artritis reumatoidea, la terapia para SpA debe continuarse indefinidamente debido a que la actividad de la enfermedad reaparece pocas semanas luego de suspender el tratamiento anti-TNF-α. Los estudios actuales buscan establecer las dosis óptimas y su duración, para mantener la remisión de la enfermedad, en los pacientes con SpA. Algunas de las desventajas de estas terapias son los altos costos, la predisposición a las infecciones bacterianas, la reactivación de tuberculosis latente y la desmielinización, entre otros (128-133, 137).

Entre los diferentes medicamentos en estudio experimental para el tratamiento de la EA se encuentran el pamidronato, un bifosfonato que requiere una infusión intravenosa (138,139), y la talidomida (140,141). Los efectos terapéuticos del pamidronato pueden deberse a sus efectos antiinflamatorios y no por sus efectos en la resorción ósea. Los bifosfonatos orales usados en el tratamiento de la osteoporosis no parecen tener este efecto antiinflamatorio. La eficacia terapéutica de la talidomida puede resultar en parte por su conocido efecto leve anti-TNF-α, por un aumento en la tasa de degradación del RNA mensajero del TNF (140-142). Sus principales efectos adversos son teratogenicidad, somnolencia y neuropatía periférica.

Conclusión

En conclusión, las SpA son un grupo de enfermedades musculoesqueléticas, inflamatorias crónicas, que se sobreponen y se interrelacionan; que ocurren en individuos genéticamente predispuestos y son disparadas por factores ambientales. Los genes del HLA están involucrados en la susceptibilidad genética, pero las vías moleculares que delinean, son hasta hoy, desconocidas (143). Genes adicionales incluyen los de susceptibilidad para psoriasis y enfermedad inflamatoria crónica. Avances significativos en el tratamiento se han logrado, en especial el uso de anti-TNF-α está cambiando el curso clínico de estos pacientes. Sin embargo, futuros estudios orientados a esclarecer los aspectos fisiopatológicos de las SpA son necesarios para la generación de tratamientos más efectivos y mejor tolerados.

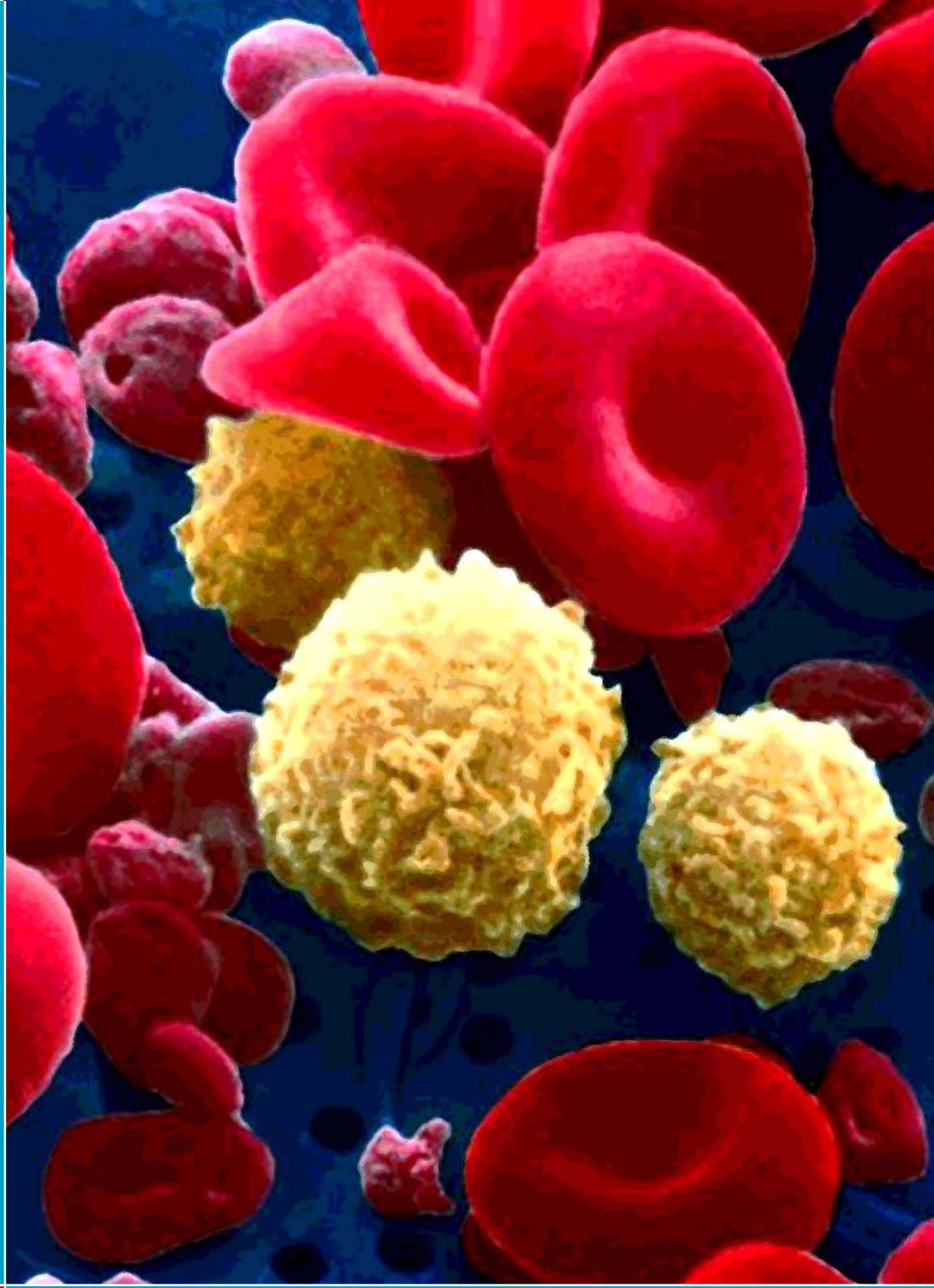
Referencias

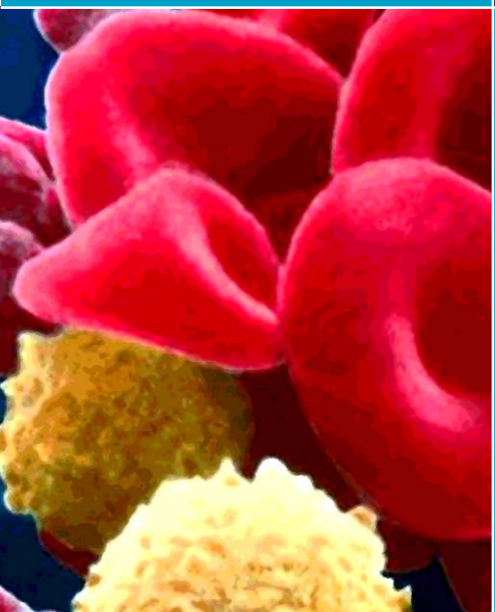
1. Calin A, Taurog J. Spondylarthritides. New York: Oxford Univ Pr 1998:1-347
2. van der Linden SJ, van der Heijde D. Ankylosing spondylitis. Rheum Dis Clin North Am 1998;24:663-915
3. Yu D. Spondylarthopathies. En: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, eds. Kelley's Textbook of Rheumatology. 6ta ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000:1039-53
4. Khan MA, ed. Spondyloarthropathies. Philadelphia: WB Saunders; 1992.
5. Moll JM, Wright V. Association between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behc¸et's syndrome.Medicine (Baltimore). 1974;53:343-64
6. Cassidy JT, Petty RE, eds. Textbook of Pediatric Rheumatology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001
7. Khan MA. Spondyloarthropathies. In: Hunder G, ed. Atlas of Rheumatology. Philadelphia: Current Science 1998:5.1-5
8. Khan MA, van der Linden SM. A wider spectrum of spondyloarthropathies. Semin Arthritis Rheum. 1990;20:107-13
9. Zeidler H, Mau W, Khan MA. Undifferentiated spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am 1992;18:187-202
10. Olivieri I, Salvarani C, Cantini F, Ciancio G, Padula A. Ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthropathies: a clinical review and description of a disease subset with older age at onset. Curr Opin Rheumatol. 2001;13: 280-4.
11. Francois RJ, Gardner DL, Degrave EJ, Bywaters EG. Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. Arthritis Rheum 2000;43:2011-24
12. Braun J, Khan MA, Sieper J. Enthesitis and ankylosis in spondyloarthropathy: what is the target of the immune response? Ann Rheum Dis 2000;59:985-94
13. Francois RJ, Braun J, Khan MA. Entheses and enthesitis: a histopathologic review and relevance to spondyloarthritides. Curr Opin Rheumatol 2001;13: 255-64
14. McGonagle D, Khan MA, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Gibbon W, Emery P. Enthesitis in spondyloarthropathy. Curr Opin Rheumatol 1999;11: 244-50
15. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis of disease localization in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. J Anat 2001;199: 503-26
16. Laloux L, Voisin MC, Allain J, et al. Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2001;60:316-21
17. Braun J, Bollow M, Sieper J. Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am 1998;24:697-735
18. Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis—at the interface of bone and cartilage [Editorial]. J Rheumatol 2000;27:2295-301
19. Edwards JC, Bowness P, Archer JR. Jekyll and Hyde: the transformation of HLA-B27. Immunol Today. 2000;21:256-60
20. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. Lancet 1973;1:904-7
21. Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations [Editorial]. Curr Opin Rheumatol 1995;7:263-9
22. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, et al. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. Ann Rheum Dis 1996;55:268-70
23. Alharbi SA, Mahmoud FF, Al Awadi A, Al Jumma RA, Khodakhast F, Alsulaiman SM. Association of MHC class I with spondyloarthropathies in Kuwait. Eur J Immunogenet 1996;23:67-70
24. al-Arfaj A. Profile of Reiter's disease in Saudi Arabia. Clin Exp Rheumatol 2001;19:184-6
25. Khan MA, Khan MK. Diagnostic value of HLA-B27 testing ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Ann Intern Med 1982;96:70-6
26. Khan MA. Ankylosing spondylitis: clinical features. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. Rheumatology. 2nd ed. London: Mosby-Wolfe; 1998:6.16.1-6.16.10
27. Boyer GS, Templin DW, Bowler A, et al. Spondyloarthropathy in the community: clinical syndromes and disease manifestations in Alaskan Eskimo populations. J Rheumatol 1999;26:1537-44
28. Collantes E, Veroz R, Escudero A, et al. Can some cases of 'possible' spondyloarthropathy be classified as 'definite' or 'undifferentiated' spondyloarthropathy? Value of criteria for spondyloarthropathies. Spanish Spondyloarthropathy Study Group. Joint Bone Spine. 2000; 67: 516-20
29. Ertürk M, Alaca R, Tosun E, Duruöz MT. Evaluation of the Amor and ESSG classification criteria for spondylarthropathies in a Turkish population. Rev Rhum Engl Ed 1997;64:293-300
30. Hukuda S, Minami M, Saito T, et al. Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan Ankylosing Spondylitis Society. J Rheumatol 2001;28:554-9
31. Gran JT, Husby G, Hordvik M. Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromso, northern Norway. Ann Rheum Dis 1985; 44: 359-67
32. Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. Arthritis Rheum 1998;41:58-67
33. Saraux A, Guedes C, Allain J, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. Société de Rhumatologie de l'Ouest. J Rheumatol 1999;26:2622-7
34. Bañares A, Hernández-García C, Fernández-Gutiérrez B, Jover JA. Eye involvement in the spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am 1998;24: 771-84
35. Pato E, Bañares A, Jover JA, et al. Undiagnosed spondyloarthropathy in patients presenting with anterior uveitis. J Rheumatol 2000; 27:2198-202
36. Huppertz H, Voigt I, Müller-Scholden J, Sandhage K. Cardiac manifestations in patients with HLA B27-associated juvenile arthritis. Pediatr Cardiol 2000;21:141-7
37. Kim TH, Jung SS, Sohn SJ, Park MH, Kim SY. Aneurysmal dilatation of ascending aorta and aortic insufficiency in juvenile spondyloarthropathy. Scand J Rheumatol 1997;26:218-21
38. Roldán CA, Chávez J, Wiest PW, Qualls CR, Crawford MH. Aortic root disease and valve disease associated with ankylosing spondylitis. J Am Coll Cardiol 1998;32:1397-404
39. Bergfeldt L. HLA-B27-associated cardiac disease. Ann Intern Med 1997; 127:621-9
40. Khan MA, Kushner I. Diagnosis of ankylosing spondylitis. In: Cohen AS, ed. Progress in Clinical Rheumatology. vol 1. New York: Grune and Stratton; 1984: 145-78
41. Mader R. Atypical clinical presentation of ankylosing spondylitis. Semin Arthritis Rheum 1999;29:191-6
42. Blackburn WD Jr, Alarcon GS, Ball GV. Evaluation of patients with back pain of suspected inflammatory nature. Am J Med. 1988;85:766-70.
43. Khan MA, van der Linden SM, Kushner I, Valkenburg HA, Cats A. Spondylitic disease without radiologic evidence of sacroiliitis in relatives of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients. Arthritis Rheum 1985;28:40-3
44. van der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, et al. Chest pain without radiographic sacroiliitis in relatives of patients with ankylosing spondylitis. J Rheumatol 1988;15:836-9
45. Dawes PT, Sheeran TP, Hothersall TE. Chest pain—a common feature of ankylosing spondylitis. Postgrad Med J 1988;64:27-9
46. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. Arthritis Rheum 1984;27:361-8
47. Ahlström H, Feltelius N, Nyman R, Hällgren R. Magnetic resonance imaging of sacroiliac joint inflammation. Arthritis Rheum 1990; 33: 1763-9
48. Bollow M, Biedermann T, Kannenberg J, et al. Use of dynamic magnetic resonance imaging to detect sacroiliitis in HLA-B27 positive and negative children with juvenile arthritides. J Rheumatol 1998; 25:556-64
49. Kidd BL, Cawley MI. Delay in diagnosis of spondarthritis. Br J Rheumatol 1988;27:230-2
50. Boyer GS, Templin DW, Bowler A, et al. A comparison of patients with spondyloarthropathy seen in specialty clinics with those identified in a communitywide epidemiologic study. Has the classic case misled us? Arch Intern Med 1997;157:2111-7
51. Feldtkeller E, Bruckel J, Khan MA. Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups. Curr Opin Rheumatol 2000; 12:239-47
52. Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, et al. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. J Rheumatol 1999;2 6:980-4
53. Khan MA, Kushner I, Braun WE. Comparison of clinical features in HLAB27 positive and negative patients with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1977;20:909-12
54. Gratacós J, Collado A, Pons F, et al. Significant loss of bone mass in patients with early, active ankylosing spondylitis: a followup study. Arthritis Rheum 1999;42:2319-24
55. Lange U, Jung O, Teichmann J, Neeck G. Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and parathyroid hormone in ankylosing spondylitis. Osteoporos Int 2001; 12:1031-5
56. Mitra D, Elvins DM, Speden DJ, Collins AJ. The prevalence of vertebral fractures in mild ankylosing spondylitis and their relationship to bone mineral density. Rheumatology (Oxford). 2000;39:85-9
57. Ticó N, Ramón S, García-Ortun F, et al. Traumatic spinal cord injury complicating ankylosing spondylitis. Spinal Cord 1998;36:349-52

58. Finkelstein JA, Chapman JR, Mirza S. Occult vertebral fractures in ankylosing spondylitis. Spinal Cord 1999;37:444-7
59. Resnick D, Williamson S, Alazraki N. Focal spinal abnormalities on bone scans in ankylosing spondylitis: a clue to the presence of fracture or pseudarthrosis. Clin Nucl Med 1981;6:213-7
60. Shih TT, Chen PQ, Li YW, Hsu CY. Spinal fractures and pseudoarthrosis complicating ankylosing spondylitis: MRI manifestation and clinical significance. J Comput Assist Tomogr 2001;25:164-70
61. Hughes RA, Keat AC. Reiter's syndrome and reactive arthritis: a current view. Semin Arthritis Rheum 1994;24:190-210
62. Keat A. Reactive arthritis. Adv Exp Med Biol 1999;455:201-6
63. Sieper J, Rudwaleit M, Braun J, van der Heijde D. Diagnosing reactive arthritis: role of clinical setting in the value of serologic and microbiologic assays. Arthritis Rheum 2002;46:319-27.
64. Inman RD, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Chlamydia and associated arthritis. Curr Opin Rheumatol 2000; 12:254-62
65. Amor B. Reiter's syndrome. Diagnosis and clinical features. Rheum Dis Clin North Am 1998;24:677-95, vii
66. Granfors K, Ma¨rker-Hermann E, De Keyser P, Khan MA, Veys EM, Yu DT. The cutting edge of spondyloarthropathy research in the millennium. Arthritis Rheum 2002;46:606-13
67. Schwartzenberg JM, Smith DD, Lindsley HB. Bacillus Calmette-Guérin associated arthropathy mimicking undifferentiated spondyloarthropathy. J Rheumatol 1999;26:933-5
68. Nesher G. Bacillus Calmette-Guérin induced reactive arthritis.J Rheumatol 1999;26:1638
69. Hannu T, Puolakkainen M, Leirisalo-Repo M. *Chlamydia pneumoniae* as a triggering infection in reactive arthritis. Rheumatology (Oxford). 1999;38:411-4
70. Kanakoudi-Tsakalidou F, Pardalos G, Pratsidou-Gertsi P, Kansouzidou-Kanakoudi A, Tsangaropoulou-Stinga H. Persistent or severe course of reactive arthritis following *Salmonella enteritidis* infection. A prospective study of 9 cases. Scand J Rheumatol 1998;27:431-4
71. Flórez D, Márquez J, Garza M, Espinoza LR. Reactive arthritis: newer developments. Rheum Dis Clin N Am 2003; 29: 37-59
72. Katz JP. Rheumatologic manifestations of gastrointestinal diseases. Gastroenterol Clin N Am 1998; 27: 533-62
73. Winchester R, Bernstein DH, Fischer HD, Enlow R, Solomon G. The co-occurrence of Reiter's syndrome and acquired immunodeficiency. Ann Intern Med 1987;106:19-26
74. Toivanen P, Toivanen A. Two forms of reactive arthritis? Ann Rheum Dis 1999; 58: 737-41
75. Pacheco-Tena C, Burgos-Vargas R, Vásquez-Mellado J, Cazarín J, Pérez-Díaz J. A proposal for the classification of patients for clinic and experimental studies on reactive arthritis. J Rheumatol 1999; 26: 1338-46
76. Mijiyawa M, Oniankitan O, Khan MA. Spondyloarthropathies in sub-Saharan Africa. Curr Opin Rheumatol 2000;12:281-6
77. Barton AC, Bruce IN, Silman AJ. Genetic studies of psoriatic arthritis: dissecting joints and skin [Editorial]. J Rheumatol 2001;28:3-5
78. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. Semin Arthritis Rheum 1973;3:55-78
79. Höhler T, Märker-Hermann E. Psoriatic arthritis: clinical aspects, genetics, and the role of T cells. Curr Opin Rheumatol 2001;13:273-9
80. de Vlam K, Mielants H, Cuvelier C, De Keyser F, Veys EM, De Vos M. Spondyloarthropathy is underestimated in inflammatory bowel disease: prevalence and HLA association. J Rheumatol 2000; 27:2860-5
81. Smale S, Natt RS, Orchard TR, Russell AS, Bjarnason I. Inflammatory bowel disease and spondyloarthropathy Arthritis Rheum 2001;44: 2728-36
82. Bollow M, Fischer T, Reisshauer H, et al. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis -cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. Ann Rheum Dis 2000;59:135-40
83. McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. Lancet 1998;352:1137-40
84. Ebringer A, Wilson C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. J Med Microbiol 2000;49:305-11
85. Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, et al. Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. Immunol Rev 1999; 169:209-23
86. Khare SD, Luthra HS, David CS. HLA-B27 and other predisposing factors in spondyloarthropathies. Curr Opin Rheumatol 1998;10:282-91
87. Salmi M, Jalkanen S. Human leukocyte subpopulations from inflamed gut bind to joint vasculature using distinct sets of adhesion molecules. J Immunol 2001;166:4650-7.
88. Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML, Sorrentino R. CD8 T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. J Clin Invest 2000;106:47-53
89. Poole AR. The histopathology of ankylosing spondylitis: are there unifying hypotheses? Am J Med Sci 1998;316:228-33
90. Duchmann R, Lambert C, May E, Höhler T, Märker-Hermann E. CD4+ and CD8+ clonal T cell expansions indicate a role of antigens in ankylosing spondylitis; a study in HLA-B27+ monozygotic twins. Clin Exp Immunol 2001;123:315-22
91. Bruce IN, Silman AJ. The aetiology of psoriatic arthritis [Editorial]. Rheumatology (Oxford). 2001;40:363-6
92. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. Arthritis Rheum 1997;40:1823-8
93. Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. Curr Opin Rheuma 2001;13:265-72
94. Álvarez I, López de Castro JA. HLA-B27 and immunogenetics of spondyloarthropathies. Curr Opin Rheumatol 2000;12:248-53
95. Martínez-Borra J, González S, López-Vázquez A, et al. HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. Hum Immunol 2000;61:131-9
96. Laval SH, Timms A, Edwards S, et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic- susceptibility loci. Am J Hum Genet 2001;68:918-26
97. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JM, et al. The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. Groupe Franc¸ais d'Etude Génétique des Spondylarthropathies. Arthritis Rheum 2000;43:1356-65
98. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411: 603-6
99. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001;411:599-603
100. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001;357:1925-8
101. Nair RP, Stuart P, Henseler T, et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. Am J Hum Genet. 2000;66:1833-44.
102. García F, Marina A, Albar JP, López de Castro JA. HLA-B27 presents a peptide from a polymorphic region of its own molecule with homology to proteins from arthritogenic bacteria. Tissue Antigens 1997; 49:23-8
103. Boyle LH, Hill Gaston JS. Breaking the rules: the unconventional recognition of HLA-B27 by CD4+ T lymphocytes as an insight into the pathogenesis of the spondyloarthropathies. Rheumatology 2003; 42:404-12
104. Scofield RH, Warren WL, Koelsch G, Harley JB. A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthropathy: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:9330-4
105. Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 polymorphism. Joint Bone Spine. 2001;68: 378-82
106. Khan MA. HLA-B27 polymorphism and association with disease [Editorial]. J Rheumatol 2000;27:1110-4
107. Nasution AR, Mardjuadi A, Kunmartini S, et al. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthropathy. J Rheumatol 1997;24:1111-4
108. Olivieri I, Clancio G, Padula A, et al. The HLA-B*2709 subtype confers susceptibility to spondyloarthropathy. Arthritis Rheum 2002;46: 553-4
109. Dougados M, Revel M, Khan MA. Management of spondyloarthropathy. En: van de Putte LBA, Williams HJ, van Riel P, Furst DE, eds. Therapy of Systemic Rheumatic Disorders. New York: Marcel Dekker; 1998:375-406.
110. Khan MA. Ankylosing spondylitis. In: Rakel RE, ed. Conn's Current Therapy. Philadelphia: WB Saunders; 1999:994-6
111. Dougados M, Dijkmanns B, Khan MA, Maksymowych W, van der Linden S. Conventional therapies for ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2002;61 Suppl 3:iii40-50
112. Bulstrode SJ, Barefoot J, Harrison RA, Clarke AK. The role of passive stretching in the treatment of ankylosing spondylitis. Br J Rheumatol 1987;26: 40-2
113. Hidding A, van der Linden S, Gielen X, de Witte L, Dijkmans B, Moolenburgh D. Continuation of group physical therapy is necessary in ankylosing spondylitis: results of a randomized controlled trial. Arthritis Care Res 1994;7:90-6.
114. Kraag G, Stokes B, Groh J, Helewa A, Goldsmith C. The effects of comprehensive home physiotherapy and supervision on patients with ankylosing spondylitis—a randomized controlled trial. J Rheumatol 1990;17:228-33.
115. Bakker C, Hidding A, van der Linden S, van Doorslaer E. Cost effectiveness of group physical therapy compared to individualized therapy

for ankylosing spondylitis. A randomized controlled trial. J Rheumatol 1994;21:264-8
116. Lorig KR, Mazonson PD, Holman HR. Evidence suggesting that health education for self-management in patients with chronic arthritis has sustained health benefits while reducing health care costs. Arthritis Rheum 1993;36:439-46
117. Pal B. What counselling do patients with ankylosing spondylitis receive? Results of a questionnaire survey. Clin Rheumatol 1998; 17:306-8
118. Alaranta H, Luoto S, Konttinen YT. Traumatic spinal cord injury as a complication to ankylosing spondylitis. An extended report. Clin Exp Rheumatol 2002;20:66-8
119. Roychaudhry B, Bintley-Bagot S, Hunt J, Tunn EJ. Methotrexate in severe ankylosing spondylitis: a randomized placebo controlled, double-blind observer study [Abstract]. Rheumatology 2001;40 (Suppl 1):43
120. Koh WH, Pande I, Samuels A, Jones SD, Calin A. Low dose amitriptyline in ankylosing spondylitis: a short term, double blind, placebo controlled study. J Rheumatol 1997;24:2158-61
121. Frydén A, Bengtsson A, Foberg U, et al. Early antibiotic treatment of reactive arthritis associated with enteric infections: clinical and serological study. BMJ 1990;301:1299-302
122. Toivanen A, Yli-Kerttula T, Luukkainen R, Merilahti-Palo R, Granfors K, Seppälä J. Effect of antimicrobial treatment on chronic reactive arthritis. Clin Exp Rheumatol 1993;11:301-7
123. Sieper J, Fendler C, Laitko S, et al. No benefit of long-term ciprofloxacin treatment in patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis: a three-month, multicenter, doubleblind, randomized, placebo-controlled study. Arthritis Rheum 1999;42:1386- 96
124. Wakefield D, McCluskey P, Verma M, Aziz K, Gatus B, Carr G. Ciprofloxacin treatment does not influence course or relapse rate of reactive arthritis and anterior uveitis. Arthritis Rheum 1999;42:1894-7
125. Lauhio A, Leirisalo-Repo M, Lähdevirta J, Saikku P, Repo H. Double-blind, placebo-controlled study of three-month treatment with lymecycline in reactive arthritis, with special reference to *Chlamydia* arthritis. Arthritis Rheum1991;34:6-14
126. Bardin T, Enel C, Cornelis F, et al. Antibiotic treatment of venereal disease and Reiter's syndrome in a Greenland population. Arthritis Rheum 1992;35:190-4
127. Braun J, de Keyser F, Brandt J, Mielants H, Sieper J, Veys E. New treatment options in spondyloarthropathies: increasing evidence for significant efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy. Curr Opin Rheumatol 2001;13: 245-9
128. Braun J, Brandt J, Listing J, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomized controlled multicenter trial. Lancet 2002;359:1187-93
129. Brandt J, Haibel H, Cornely D, et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. Arthritis Rheum 2000;43:1346-52
130. Van Den Bosch F, Kruithof E, Baeten D, et al. Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondyloarthropathy. Arthritis Rheum 2002;46:755-65
131. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. Lancet 2000;356:385-90
132. Zabraniecki L, Fournié B. TNF alpha inhibition in psoriatic arthritis: cause for hope [Editorial]. Joint Bone Spine. 2001;68:106-8
133. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, et al. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med 2000;342: 763-9
134. van der Heijde D, van der Linden S, Bellamy N, Calin A, Dougados M, Khan MA. Which domains should be included in a core set for endpoints in ankylosing spondylitis? Introduction to the ankylosing spondylitis module of OMERACT IV. J Rheumatol 1999;26:945-7
135. van der Heijde D, Calin A, Dougados M, Khan MA, van der Linden S, Bellamy N. Selection of instruments in the core set for DC-ART, SMARD, physical therapy, and clinical record keeping in ankylosing spondylitis. Progress report of the ASAS Working Group. Assessments in Ankylosing Spondylitis. J Rheumatol 1999;26:951-4
136. Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. N Engl J Med 2002; 346:1349-56
137. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, et al. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:2862-9
138. Maksymowych WP, Jhangri GS, Fitzgerald AA, et al. A six-month randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-refractory ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 2002;46:766-73
139. Maksymowych WP, Lambert R, Jhangri GS, et al. Clinical and radiological amelioration of refractory peripheral spondyloarthritis by pulse intravenous pamidronate therapy. J Rheumatol 2001;28:144-55
140. Breban M, Gombert B, Amor B, Dougados M. Efficacy of thalidomide in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1999;42: 580-1
141. Wendling D, Toussirot E, Michel F. Thalidomide: a comeback? [Editorial] Joint Bone Spine. 2000;67:259-61
142. Calabrese LH, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. Am J Med 2000;108:487-95
143. Said-Nehal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, et al. The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families. Ann Rheum Dis 2002;61:201-6

SECCIÓN IV





Terapéutica

32

ANTI INFLAMATORIOS A. NO ESTEROIDEOS

Ricardo Pineda-Tamayo

Contenido

Mecanismo de acción y función de las prostaglandinas
Características de las isoformas ciclo-oxigenasa
Clasificación de los anti-inflamatorios no esteroideos
Utilidad clínica
Efectos adversos

Los procesos de dolor e inflamación son componentes importantes de una gran diversidad de condiciones patológicas. Los anti-inflamatorios no esteroideos son herramientas terapéuticas de gran valor. El mecanismo por el cual estos medicamentos ejercen su acción está bien entendido, sin embargo las consecuencias fisiológicas y patológicas de la regulación del proceso inflamatorio solo se están dilucidando en años recientes y la euforia por reducir los efectos adversos asociados a la inhibición de la ciclo-oxigenasa con medicamentos más específicos parece ceder el paso a conceptos más racionales al momento de su utilización.

Introducción

Por más de 100 años, los extractos de sauce y otras plantas y su ingrediente activo: Los salicilatos fueron utilizados para el alivio del dolor, la fiebre y la inflamación asociada a la artritis. En un esfuerzo por hacer más agradable el sabor de los salicilatos, Felix Hoffman Bayer fabricó un simple derivado acetilsalicilato o aspirina. Este medicamento fue más efectivo en la reducción del dolor que los salicilatos previos y fue durante 80 años el principal medicamento para el control del dolor, la fiebre y la inflamación (1). En 1as décadas de los años 60's y 70's se desarrollaron diversos medicamentos salicilatos y no salicilatos y muchos de ellos fueron mucho mejores que la aspirina (1). En años recientes ha quedado bien establecido el papel de la aspirina como agente protector de trombosis en la enfermedad arteriosclerótica, como agente quimioprotector en cáncer de colon y en enfermedad de Alzheimer (2,3).

Los Antiinflamatorios no esteroideos AINES son potentes medicamentos utilizados en el control del dolor y la inflamación. El objetivo del presente capítulo es describir el mecanismo de acción de los AINES y su desempeño en la regulación de los mecanismos de inflamación y posibles efectos adversos derivados de su utilización. Figura 1.

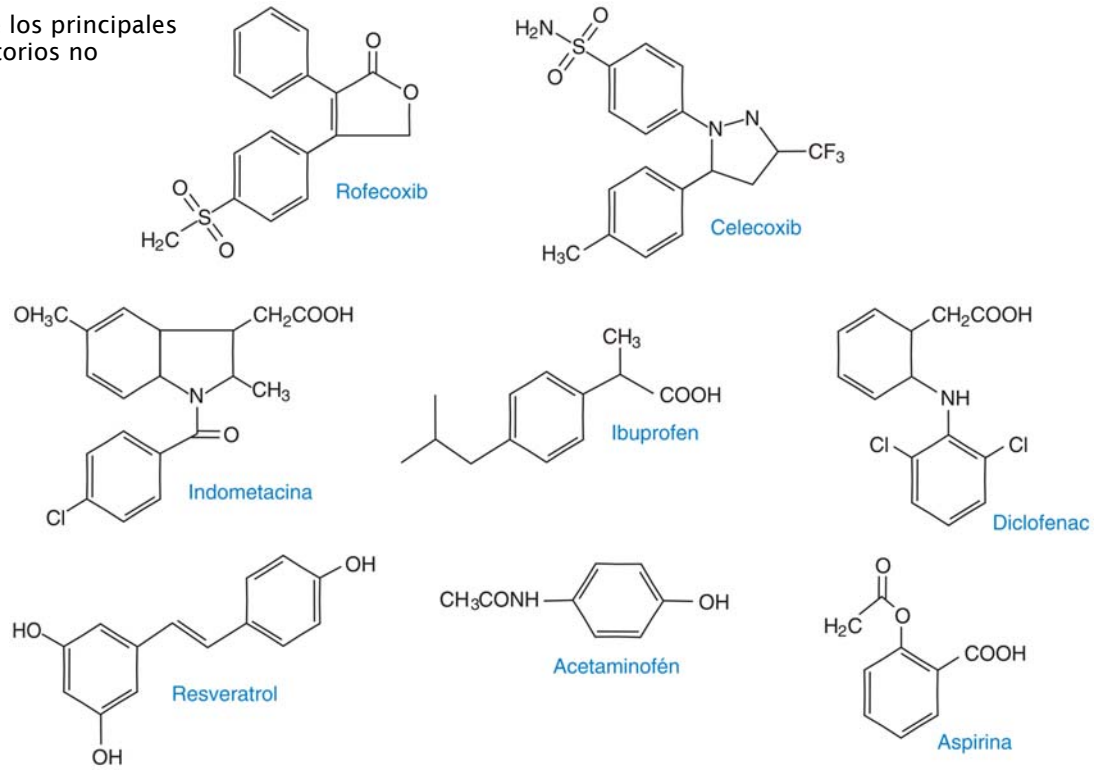
Mecanismo de acción y función de las prostaglandinas

El mecanismo de acción de los AINES fue desconocido por muchos años hasta que en 1971, se descubrió que eran eficaces inhibidores de la síntesis de prostaglandinas (PG), cuya principal función consiste en mediar en los procesos fisiológicos de dolor e inflamación. El proceso de síntesis de PG comienza con la activación enzimática de fosfolipasas, en especial fosfolipasa A2 (FA2) en respuesta a estímulos químicos físicos u hormonales que inducen la síntesis de ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática. El AA es metabolizado hasta PG y tromboxanos (TX) a través de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina endoperóxido sintasa. Las PG sintetizadas son inestables y necesitan una segunda acción enzimática para inducir su transformación a PG estables proceso que es mediado por un grupo de isomerasas; el resultado de esta transformación es la producción de PGD2, PGI2, PGE2 y PGF2α. En general el tipo particular de PG producido por un tipo de célula dado, está determinado por el tipo de PG sintasa presente en cada célula. (2-4) Tabla 1 y Figura 2.

Tabla 1. Función de las prostaglandinas en los procesos de inflamación.

PGE2, PGI2	Vasodilatación
	Acción sinérgica con otros mediadores: bradiquinina, histamina,
	C5a, y leucotrieno B4. Incremento de la permeabilidad vascular.
	Broncodilatación
	Inhibición de la agregación plaquetaria
	Estimulación de la resorción ósea
PGD2	Vasodilatación
	Incremento de la permeabilidad vascular
	Broncoconstricción
	Estimulación de la migración rápida de neutrófilos y eosinófilos

Figura 1.
Estructura de los principales anti- inflamatorios no esteroideos.



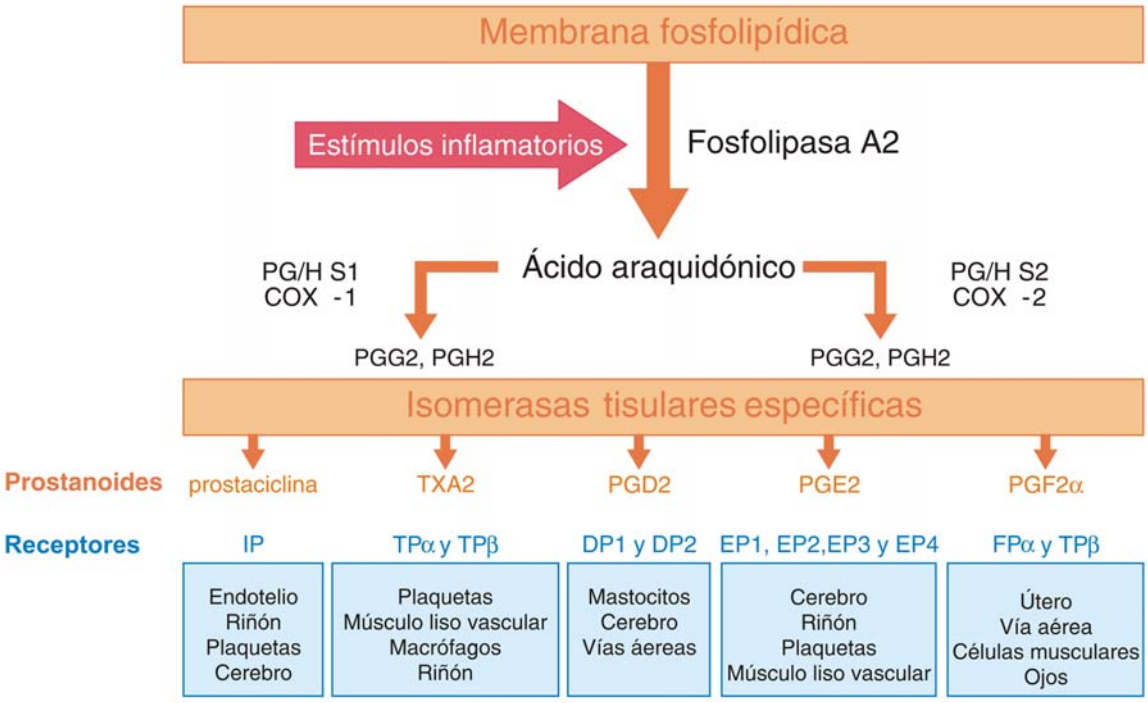


FIGURA 2.
Producción de prostaglandinas y tromboxanos.
PG/H S1y S2:b Prostaglandina sintasa 1 y 2. COX-1 y 2: Ciclo-oxigenasas 1 y 2, TXA2:tromboxano A2, PGD2: Prostaglandina D2, PGE2: Prostaglandina E2, PGF2α: Prostaglandina F2 alfa, IP: Receptor de prostaciclina, TP: receptor de tromboxanos, DP: receptores de prostaglandina D, EP: Receptores de prosta-glandina E, FP: receptores de prostaglandina F. Adaptado de (48)

La acción reguladora que tienen los AINES en la síntesis de las PG, se logra mediante la inhibición de la COX. El mecanismo de inactivación de la COX para el caso de la aspirina, ocurre por la formación de puentes iónicos entre su grupo acetilo y la serina 530 (serina activa de la COX), esta acetilación es suficiente para prevenir la ciclización y la oxigenación del ácido araquidónico a PGG2, algunos otros AINES disponibles hacen inhibición permanente de la enzima mediante enlaces covalentes. (3,4, 5,6).

Características de las isoformas ciclo-oxigenasa

Existe suficiente evidencia que respalda el concepto de la existencia de dos isoformas de COX (COX-1 y COX-2) (7,8) y que la actividad de alguna isoforma en particular podría ser la responsable de las consecuencias patológicas de la actividad de PG, mientras que la actividad de otra estaría mediando en los procesos homeostáticos (8). Estos descubrimientos han permitido también usar en forma racional los AINES aprovechando los beneficios terapéuticos de la inhibición de la COX-2 limitando algunos de sus efectos adversos o inhibiendo la COX-1 como es el caso del uso de AINES como antiagregantes plaquetarios.

La COX-1 es la única isoforma presente en las plaquetas y se expresa de forma constitutiva en muchos otros tejidos en donde ejerce acciones homeostáticas. Uno de sus principales efectos fisiológicos es mantener la integridad del tejido gástrico mediante la acción de PG; sin embargo, la expresión de la COX-1 está incrementada en los procesos inflamatorios articulares (9). La COX-2 por el contrario es una enzima inducible mediante el estímulo inflamatorio y está presente en diversas células inflamatorias tales como, la vasculatura endotelial, los monocitos y los fibroblastos de la sinovia infiltrante reumatoide y en las células espumosas de las placas arterioscleróticas (10,11).

Ambas enzimas son codificadas por genes diferentes y tienen cierta similitud en sus secuencias de aminoácidos, mientras el gen de la COX-1 está localizado en el cromosoma 9, el gen de la COX-2 está en el cromosoma 1. Su ubicación intracelular es diferente, la COX-1 está en el retículo endoplásmico mientras que, entre un 80-90% de la COX-2 está localizada en la membrana nuclear y solo un pequeño porcentaje queda distribuido entre el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y citoplasma (12). Una de las principales diferencias entre las isoformas de COX es el nivel de expresión basal y regulación del RNA mensajero (mRNA). El gen de la COX-1 tiene las características de un gen constitutivo el cual está transcribiéndose y expresándose constantemente y en donde están ausentes los elementos TATA y CAAT de las regiones promotoras, en consecuencia el RNAm de la COX-1 y su proteína se expresan en casi todos los tejidos (12). El gen de la COX-2 tiene la estructura típica de los genes altamente regulados tal como la presencia de los elementos TATA y CAAT en sus regiones promotoras, así como los sitios de unión de factores de transcripción que incrementan la síntesis

de la enzima ante estímulos externos y puede ser inducida por diversos factores como IL1, TNFα y otros factores de crecimiento asociados con inflamación (10,14,15). Además la expresión de la COX-2 está muy restringida en condiciones basales, salvo en tejido cerebral, conductos deferentes y córtex renal (15). Las funciones de las dos isoformas de la COX quedan resumidas en la Tabla 2.

Aunque la COX-2 ha sido descrita como una enzima típicamente patológica, hoy en día se sabe que tiene diversas acciones fisiológicas; se conoce, por ejemplo, que esta enzima es transitoria y que es rápidamente inducida por la hormona luteinizante en los folículos pre-ovulatorios y podría ser la responsable de la regulación de los ciclos ovulatorios (16,17). Se ha demostrado también que la COX-2 está presente en los podocitos y en la vasculatura renal y su rol en la función renal parece soportado por la presencia de edemas e hipertensión arterial cuando se inhibe la enzima por acción de fármacos específicos, lo cual también afecta la producción de prostaciclina intrarrenal y disminuye en forma transitoria de la excreción de sodio (15,18,19).

Tabla 2. Características generales y funciones de las ciclooxigenasas.

COX-1 constitutiva
Funciones homeostáticas
Protección de la mucosa gástrica
Activación plaquetaria
Función renal
Diferenciación de macrófagos
COX-2 inducible
Funciones fisiológicas
Reproducción
Funciones renales
Desarrollo del riñón
Funciones patológicas
Fiebre
Dolor
Angiogénesis
Reparación tisular

La COX-1 puede ser inducible en procesos de diferenciación celular y la COX-2 puede ser constitutiva en algunos otros tejidos.

Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

Los AINES pueden clasificarse en tres grupos dependiendo del modo de inhibición de la COX. En la clase I se ubican los inhibidores simples competitivos entre los cuales están casi todos los AINES; en la clase II están los inhibidores competitivos reversibles, los cuales son además "tiempo dependientes" entre ellos están: flurbiprofén, indometacina, meclofenamato, diclofenac y nimesulide. En la clase III están los inhibidores irreversibles "tiempo dependientes", en donde están todos los derivados de los salicilatos (20,21). La otra forma de clasificar los AINES consiste en la especificidad en la inhibición de las isoformas de COX, la cual resulta compleja debido a que la selectividad de los AINES por una u otra enzima no es absoluta. La selectividad bioquímica de cualquiera de los AINES, en particular, es dependiente de la concentración (22,23). La actividad relativa de los AINES sobre la COX-1 ó 2 se define como el IC50, el cual representa la cantidad de medicamento necesario para inhibir la actividad de la enzima en un 50%. La relación COX2/COX1 es el equivalente al IC50 de COX-2 dividido en el IC50 de COX-1. Una relación menor que 1 define un AINE selectivo o preferencial COX-2, mientras que una relación mayor que 1 define a un AINE como más COX 1 selectivo; cuando la relación es menor de 0.01 se define un AINE como muy selectivo (24). Ver Figura 3. Las diferencias específicas en la utilización de inhibidores selectivos de la COX-2 con respecto a inhibidores inespecíficos queda resumida en la Tabla 4.

Figura 3.
Actividad relativa COX-1/COX-2 en función de la concentración del medicamento.
IC50: concentración inhibitoria del 50%.

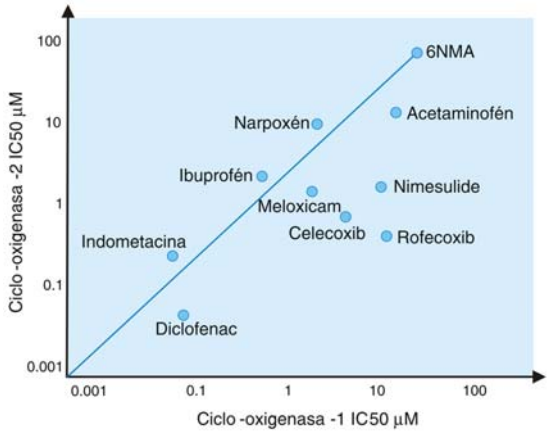


Tabla 3. Clasificación de los AINES de acuerdo a la selectividad por la COX-2.

Medicamento	Relación IC50 COX-2/ IC50 COX-1
COX-1 selectivos	
Aspirina	5.25/163
Diclofenac	0.06/7.59
Ibuprofén	0.8/53
Indometacina	5.2/60
Ketoprofen	4.6
Naproxén	0.59/59
Ácido mefenámico	20
Piroxicam	7.7/300
Tenoxicam	1.34
COX-2 preferenciales	
Etodolaco	0.8
Meloxicam	0.01/0.8
Nimesulide	0.01/0.9
COX-2 específicos	
Celecoxib	0.00027
Rofecoxib	0.001
Valdecoxib	0.006
Etoricoxib	0.003

Adaptada de: Osiri M, Moreland L. Specific cyclooxygenase 2 inhibitors: A new choise of nonsteroidal anti-inflamatory drug therapy. Arthritis Care Res.1999;12:359-62

Tabla 4. Acciones de los AINES inhibidores de la COX según la selectividad.

	Inhibidores no selectivos	Inhibidores COX-2 selectivos
Antiinflamatorios	††††	††††
Antipiréticos	††††	††
Analgésicos	††††	††††
Analgésicos centrales	-	††
Úlceras gastrointestinales	††††	††
Antiplaquetarios	††††	-
Retención hidrosalina, Hipertensión	††††	††
< Tasa de filtración glomerular	††††	††

La inmensa mayoría de los AINES disponibles en la actualidad son inhibidores preferenciales COX-1 y sólo algunos agentes recientemente desarrollados pertenecen a la familia de los COX-2 selectivos. Ver Tabla 3.

Utilidad clínica de los AINES

Los AINES son medicamentos utilizados con mucha frecuencia en el tratamiento de la artritis, el dolor menstrual, cefaleas y como agentes anti-agregantes plaquetarios. Las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas de los AINES están bien establecidas casi desde su introducción. La inhibición específica de COX-1 y COX-2 es capaz de disminuir la concentración de PG en los tejidos inflamados dado que éstas actúan prolongando los efectos inflamatorios de bradiquinina, histamina óxido nítrico y otros mediadores de inflamación periféricos (25). No obstante, se ha demostrado que sólo la inhibición de COX-2 es capaz de disminuir la inflamación y la hiperalgesia de origen central o neurogénico; este hecho se ha visto comprobado mediante experimentos que han demostrado que el bloqueo específico de COX-2 se relaciona con disminución de los niveles de PGE2 en el líquido céfalo-raquídeo (26).

Existe una evidencia amplia acerca de la función de las PG en el desarrollo del cáncer de colon. En modelos animales se ha demostrado que el uso de AINES limita la progresión de este tumor. Las personas que toman AINES con regularidad, tienen una disminución entre un 40% al 50% en el riesgo de desarrollar cáncer de colon y en una condición pre-maligna conocida como poliposis adenomatosa familiar, se ha observado que el uso de AINES induce regresión de los adenomas (3). Uno de los mecanismos propuestos para este efecto parece ser la sobreexpresión de la COX-2 en los adenomas y en los carcinomas de colon, en modelos de ratones está sobreexpresión confiere al epitelio una resistencia a la apoptosis, a una alteración en los mecanismos reguladores del crecimiento y a que se promuevan los mecanismos de angiogénesis que permiten la supervivencia del tumor (27-29).

La eficacia de los AINES ha sido demostrada en osteoartritis (OA). No parece existir ninguna diferencia en la eficacia entre los COX-1 y los COX-2 selectivos, así, por ejemplo, la eficacia de diclofenac 75 mg dos veces al día comparado con rofecoxib 12.5 o 25 mg al día mostró una eficacia comparable en OA de caderas. Con rofecoxib y celecoxib se demostró que el dolor y la inflamación en pacientes con OA de rodillas y caderas eran superiores a placebo y se ha observado un alivio de los síntomas en pacientes con artritis reumatoidea (AR) (30-33).

Una de las propiedades más interesantes de los AINES tiene que ver con su efecto como antiagregantes plaquetarios. Las plaquetas por su característica de células anucleadas las hace objetivos perfectos para la acción de la aspirina. Una vez que ésta ha acetilado a la COX el sustrato del sitio activo de la enzima se suprime durante todo el tiempo de vida de la plaqueta y en consecuencia, la formación de tromboxano A2 (TXA2) requerirá de la formación de nuevas plaquetas las cuales se regeneran lentamente a la tasa de un 10% por día (34).

El uso de aspirina ha demostrado ser efectivo en la prevención secundaria de eventos cardiovasculares (35), la evidencia con otros AINES es limitada y los reportes de casos y controles sugieren que estos agentes no reducen el riesgo de infarto de miocardio. Algunos investigadores se han preguntado si el efecto benéfico antiplaquetario puede inhibirse mediante la acción de otros AINES; en tal sentido, Catella-Lawson et al (35). demostraron que la administración de ibuprofén antagoniza el efecto antiplaquetario de aspirina y pone en riesgo el efecto cardioprotector de esta última. En contraste, la administración de rofecoxib, acetaminofén y diclofenac no antagonizan el efecto. En líneas generales, muchos autores recomiendan que se haga uso de bajas dosis de aspirina en aquellos pacientes que necesitan antiplaquetarios, a pesar del uso concomitante de otros AINES (15).

Existe alguna evidencia del papel de la COX-2 en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, ésta resulta de un proceso degenerativo de las células cerebrales que puede originarse de un estímulo inflamatorio crónico que conlleva al depósito anormal de proteína amiloide. Se ha demostrado que IL-1β e IL-6 inducen la expresión de COX-2 en cultivos de células cerebrales (36,37). Hay estudios que han mostrado un efecto protector del desarrollo de la enfermedad con la utilización por un largo tiempo de AINES (38).

Efectos adversos de los AINES

Efectos cardiovasculares

La COX-1 es expresada constitutivamente en los cultivos de células endoteliales y en las células del músculo liso vascular mientras que la COX-2 se induce por el estímulo de citoquinas, factores de crecimiento esteres de forbol y lipopolisacárido, estas observaciones sugieren que la COX-2 es importante en la formación de prostaciclina que ocurre en los síndromes de agregación plaquetaria (39), el uso de inhibidores COX-2 puede disminuir la excreción urinaria de prostaciclina y los niveles de producción de la misma. Si se tiene en cuenta que la prostaciclina

juega un papel importante en los mecanismos de defensa que limitan las consecuencias de la hiper-agregación plaquetaria, valdría la pena preguntarse si la inhibición de la COX-2 incrementa el riesgo de trombosis: El conocido estudio VIGOR (40) demostró que el infarto agudo de miocardio, la apoplejía no fatal y la muerte fue mayor en el grupo de pacientes tratados con rofecoxib que los tratados con naproxén (0.8% vs. 0.4%, $P<0.05$). Sin embargo el estudio CLASS comparó celecoxib con Ibuprofén y diclofenac y no se demostró diferencia en los eventos cardiovasculares (41). A pesar de estos estudios, en años subsiguientes un cúmulo de evidencia epidemiológica sugirió que los pacientes que tomaban rofecoxib presentaban un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular y apoplejía por lo cual a mediados de 2004, rofecoxib fue retirado del mercado (42,43).

Efectos gastrointestinales

El uso de AINES se ha visto asociado con el desarrollo de mucositis gástrica difusa, erosiones gástricas, ulceras duodenales, hemorragias de tracto gastrointestinal (GI), perforaciones y muerte (44). Las úlceras gástricas o duodenales se desarrollan entre el 15 a 20% de todos los pacientes que reciben estas medicaciones y se ha demostrado que el mayor riesgo de sangrado lo tienen las personas mayores de 65 años, personas que reciben anticoagulantes orales y aquellas con historia de ulceras pépticas o hemorragias GI previas (45,46). Los pacientes con úlceras asociadas a *H. Pylori* tienen una sobreexpresión de COX-2 en la mucosa gástrica que puede disminuir después de un tratamiento adecuado, el significado del incremento de prostanoides en el curso de estas infecciones no es claro, aunque se ha observado que la inhibición de la COX-2 en modelos de monos retarda la cicatrización de las úlceras y de las lesiones erosivas de la mucosa gástrica (47,48). Además de la inhibición de la COX-1 que genera una depleción de las PG encargadas de mantener la integridad de la barrera mucosa gástrica, los efectos GI de los AINES pueden relacionarse con las propiedades químicas de los AINES, dado que casi todos son ácidos orgánicos débiles que pueden alterar el pH de la mucosa gástrica (49). El perfil de seguridad GI de los COX-2 selectivos vs. los COX no selectivos ha sido evaluado en dos estudios independientes uno para rofecoxib y otro para celecoxib. En el estudio VIGOR (40), se demostró que el riesgo de hemorragia, perforación o ulcera péptica sintomática fue menor en los pacientes que usaron rofecoxib que en el grupo de pacientes que usaron naproxén. Sin embargo en el estudio CLASS, en donde se comparó celecoxib con Ibuprofén y diclofenac, las diferencias no mostraron ser estadísticamente significativas a pesar de que hubo una tendencia a disminuir estos efectos GI (41).

Efectos renales

La toxicidad renal de los AINES está relacionada en forma directa con la inhibición de la isoenzima COX-1 la cual se localiza en la vasculatura renal, los túbulos colectores y en el asa de Henle (50). Los efectos resultantes de esta inhibición se traducen en vasoconstricción renal, disminución de la tasa de filtración glomerular y retención hidrosalina con formación de edemas e hipertensión. La formación de PG dependientes de la COX-2 parece ser necesaria para el desarrollo renal en la vida embrionaria (50,51) y ha demostrado que se localiza constitutivamente en la vasculatura renal, en la mácula densa y en las células medulares intersticiales (51). La tasa de filtración glomerular se estudió en pacientes que recibieron 50 mg al día de rofecoxib comparados con 150 mg al día de Indometacina. El resultado demostró que la filtración glomerular se afectó en un 5% a los 14 días en el grupo de indometacina y que no hubo cambios en ésta en los pacientes que recibieron rofecoxib (19). En reportes con respecto a la toxicidad renal por celecoxib, la incidencia de edema, hipertensión arterial se comportó de forma similar a como lo hacen los COX no selectivos (52,53)

Conclusiones

Los AINES son potentes medicamentos antiinflamatorios con un amplio espectro de utilización en patologías que cursan con dolor e inflamación, incluidas las artropatías inflamatorias. La aspirina, además, ha demostrado ser eficaz en el control del riesgo cardiovascular. Los AINES se pueden utilizar como agentes quimio-profilácticos en la prevención del cáncer de colon. A pesar de tales beneficios, su uso se ve limitado por el perfil de efectos adversos. Sin embargo, pocas medicaciones han sobrepasado la prueba del tiempo en forma tan eficaz como los AINES. El aprovechamiento de sus propiedades terapéuticas requiere de un conocimiento profundo de estos agentes y su utilización en forma racional.

Referencias

1. Simmons DL, Wagner D, Westover K. Nonsteroidal anti-Inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. Clin Infec Dis 2000;31(Suppl 5):S211–8
2. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. N Engl J Med 1994;330: 1287–94
3. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063–73
4. Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol 1971; 231:232–5
5. Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature 1972; 240:410–1
6. Smith TJ. Cyclooxygenases as the principal targets for the actions of NSAIDs. Rheum Dis Clin North Am 1998;24:501–23.371–86
7. Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, et al. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. J Clin Invest 1990;86:1375-9
8. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, et al. Expresión of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2692
9. Siegle I, Klein T, Backman JT, et al. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. Arthritis Rheum 1998;41:122–9
10. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues: effects of interleukin-1b, phorbol ester, and corticosteroids. J Clin Invest 1994;93:1095-101
11. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, et al. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 1999;155:1281-91
12. Amin A, Attur M, Dave M, et al. Localization and regulation of COX-2 by nitric oxide in activated murine macrophages [abstract]. Arthritis Rheum 1998;41 Suppl 9:S143
13. Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, et al. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. Biochem Biophys Res Commun 1993;190:406–11
14. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, et al. Transcriptional roles of nuclear factor kB and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 1995;270:31315–20
15. Crofford LJ, Lipsky P, Brooks P, et al. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Artritis Rheum 2000; 43:4-13
16. Sirois J, Dore M. The late induction of prostaglandin G/H synthase in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. Endocrinology 1997;138:4427–34
17. Richards JS. Sounding the alarm: does induction of the prostaglandin endoperoxide synthase-2 control the mammalian ovulatory clock? Endocrinology 1997;138:4047–8. Physiol 1997;272:F460–8
18. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96: 272–7
19. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, et al. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. J Pharmacol Exp Ther 1999;289:735-41
20. Rome LH, Lands WEH. Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. Proc Natl Acad Sci U S A 1975;72:4863–5
21. Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. Biochem J 1995;306:247–51
22. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:7563-8. [Erratum, Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:9666]
23. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998;104:413-21
24. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, et al.Cyclo-oxgenase isoenzymes. Drugs 1997;53:563–82
25. Beiche F, Scheuerer S, Brune K, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. FEBS Lett 1996;390:165–9
26. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95: 13313–8
27. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APCd716 knockout mice by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). Cell 1996;87:803–9
28. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperxide synthase 2. Cell 1995;83:493–501
29. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, et al. Cyclooxygenase regulated angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93:705–16
30. Hawkey C, Laine L, Simon T, et al. Comparison of the effect of rofecoxib (a cyclooxygenase 2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2000;43:370-7
31. Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, et al. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. Arthritis Rheum 1998;41:1591-602
32. Cannon GW, Caldwell JR, Holt P, et al. Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Arthritis Rheum 2000; 43:978-87
33. Day R, Morrison B, Luza A, et al. A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX-2 inhibitor rofecoxib vs ibuprofen in patients with osteoarthritis. Arch Intern Med 2000;160:1781-7
34. Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, et al. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. Circulation 1985;72:1177-84
35. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor S, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. N Engl J Med 2001;345:1809-17
36. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. Brain Res Rev 1995;21:195–218
37. O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, et al. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. J Neurochem 1996;66: 2532–40
38. Stewart WF, Kawas C, Carrada M, et al. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. Neurology 1997;48:626–32
39. FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, et al. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation.N Engl J Med 1984;310:1065-8
40. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2000;343:1520-8
41. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. JAMA 2000;284:1247-55
42. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N Engl J Med 2001;345:433-42
43. Mukherjee DM, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. JAMA 2001;286:954-9
44. Singh G, Ramey DR. NSAID induced gastrointestinal complications: the ARAMIS perspective-1997 J Rheumatol 1998;25 Suppl 51:8–16
45. Fries JF. NSAID gastropathy: the second most deadly rheumatic disease? Epidemiology and risk appraisal. J Rheumatol 1991;18 Suppl 28:6–10
46. Fries JF. NSAID gastropathy: epidemiology. J Musculoskel Med 1991; 8:21–8
47. McCarthy CJ, Crofford LJ, Greensom J, et al. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol 1999;94:1218–23.
48. Eckmann L, Stenson WF, Savidge TC, et al. Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria: bacterial entry induces epithelial prostaglandin H synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2aproduction. J Clin Invest 1997; 100:296–309
49. Simon LS. Biological effects of nonsteroidal anti-in-flammatory drugs. Curr Opin Rheumatol 1997;9:178–82
50. Komhoff M, Wang JL, Cheng HF, et al. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. Kidney Int 2000;57:414-22
51. Nantel F, Meadows E, Denis D, et al. Immunolocalization of cyclooxygenase 2 in the macula densa of human elderly. FEBS Lett 1999; 457:475-7
52. Whelton A, Maurath CJ, Verburg KM, et al. Renal safety and tolerability of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. Am J Ther 2000; 159-75
53. Wood A. The coxibs, selective inhibitors of ciclooxygenase-2. New Engl J Med 2001;345:433-42

32

B. GLUCOCORTICOIDES

Ricardo Pineda-Tamayo

Contenido

Mecanismo de acción de los glucocorticoides
Características del receptor de glucocorticoides
Acciones genómicas
Acciones no genómicas
Mecanismos de regulación
Consecuencias inmunológicas
Aplicaciones clínicas
Efectos adversos

Los glucocorticoides son potentes medicamentos antiinflamatorios, inmunosupresores y antineoplásicos que intervienen en diversas "circunstancias" del sistema inmune. Su mecanismo de acción es muy complejo y de éste se deriva la diversidad de aplicaciones clínicas que tienen en la actualidad. Los glucocorticoides se unen a receptores citosólicos y forman un complejo que interactúa en forma directa con las regiones promotoras del DNA o a través de factores de activación nuclear; sin embargo, son capaces de regular otros mediadores de la inflamación sin intervención en la transcripción. El estudio de la acción de los glucocorticoides en el sistema inmune es un modo fascinante de aproximación a los mecanismos básicos de funcionamiento del sistema inmunológico.

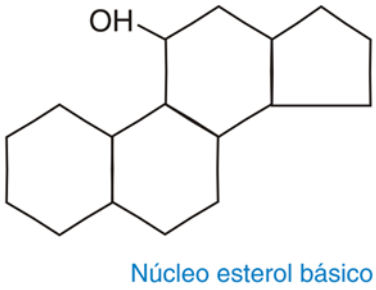
Introducción

El espectro de fármacos con actividad antiinflamatoria es amplio y se podrían citar un sinnúmero de fármacos con acción inhibitoria sobre el sistema inmune; sin embargo, en un sentido más restringido la concepción de medicamentos antiinflamatorios, hace referencia a los glucocorticoides (GC) y a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), quizás debido a la frecuencia y la diversidad de indicaciones que tienen dichas medicaciones. El presente capítulo tiene como finalidad orientar al lector acerca del mecanismo de acción y de las principales indicaciones terapéuticas de los GC.

Los GC son los medicamentos antiinflamatorios más importantes, en razón de la frecuencia de su utilización y el creciente número de indicaciones terapéuticas. Se estima que sólo en Estados Unidos, los GC se prescriben en cerca de 10.000 pacientes nuevos por año (1), en estudios realizados en la comunidad, alrededor de el 1.75% de las mujeres y el 0.5% de los hombres mayores de 55 años, utilizan GC orales (2, 3).

Los GC son hormonas esteroideas producidas por la glándula suprarrenal después de la estimulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Todas las hormonas esteroideas naturales comparten una misma estructura básica consistente en un núcleo esterol básico al cual se unen grupos químicos adicionales que confieren algunas propiedades específicas a cada uno. Figura 1. Los GC están involucrados en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune, metabolismo intermediario, crecimiento y proliferación celular, entre otros. Su efecto antiproliferativo los hace medicamentos ideales como inmunosupresores en enfermedades autoinmunes y otras condiciones inflamatorias, son además inductores de apoptosis y por eso son elementos claves en el tratamiento de muchas anormalidades hematológicas incluidos linfomas y leucemias (4,5).

Figura 1.
Estructura básica de los esteroides.



Mecanismo de acción de los glucocorticoides

Los efectos terapéuticos de los GC se pueden evaluar mediante su acción en el DNA genómico interactuando con los factores de activación nuclear y con el mismo DNA, tal efecto es conocido también como mecanismo de acción *genómico*, éste se logra con cualquier dosis (aún dosis bajas) de GC y su efecto clínico puede evaluarse sólo 30 minutos después, que es el tiempo requerido en la unión

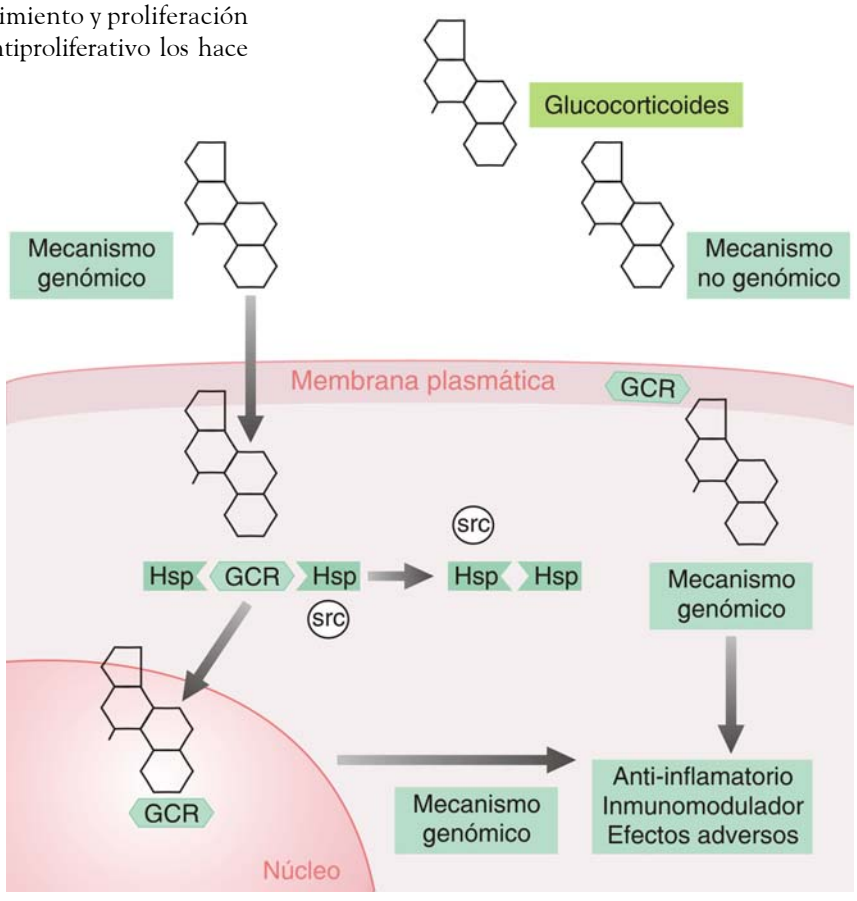


Figura 2.
Mecanismo de acción genómico y no genómico de los GC.
GCR= Receptor de GC,
Hsp = Proteínas de choque térmico.

al receptor de GC (GCR), la translocación al núcleo y sus efectos sobre la transcripción y la translación (6,7). El segundo mecanismo es conocido como *no genómico* y ocurre solo con dosis altas de GC, su efecto sucede pocos minutos después de la administración de GC (6,7). Figura 2.

Los GC son sustancias altamente lipofílicas que difunden con gran facilidad a través de todas las membranas celulares. El mecanismo básico de acción de los GC consiste en la unión de éstos a su receptor citosólico lo cual induce cambios conformacionales en el GCR, empezando por la liberación de las moléculas chaperonas, tal evento es seguido por la translocación del receptor al núcleo donde se une a secuencias específicas del DNA y modula la transcripción. Los genes pueden regularse positivamente por la acción de los GCR en las sus regiones promotoras o bien, su transcripción puede ser inhibida cuando el GCR actúa como un represor en las secuencias de DNA o a través de mecanismos independientes de DNA (8). Algunos estudios han demostrado la necesidad de que el GRC se conserve intacto para ejercer su acción y que algunas líneas celulares con receptores mutantes o ausentes evaden los efectos citotóxicos de los GC. (5,9) Figura 2.

Características del receptor de glucocorticoides

El GCR es una fosfoproteína de 85.000 a 97.000 kd que está presente a bajas concentraciones en la gran mayoría de las células de los mamíferos (10). Pertenece a la superfamilia de receptores hormonales de esteroides/tiroides los cuales incluyen receptores para esteroides sexuales, hormona tiroidea, retinoides, vitamina D y mineralocorticoides (5). Similar a otros receptores hormonales, el GCR está compuesto por una serie de dominios funcionales, que median la trascripción, la unión al ligando y la unión al DNA, a su vez dentro de los dominios existen pequeñas estructuras involucradas en la localización nuclear, dimerización e interacción con proteínas (11) (Figura 3). La forma inactiva del GCR, permanece en el citoplasma unida a proteínas que actúan como co-activadoras, corepresoras y chaperonas, entre ellas algunas proteínas de shock térmico (HSP) como Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56 y Hsp 40. Otras moléculas que componen este complejo multiprotéico son las llamadas cochaperonas tales como p23, algunas proteínas de señalización de la vía de las MAP kinasas e inmunofilinas. La función de las cochaperonas es estabilizar el complejo y participar en las etapas de enrollamiento, ensamblaje, translocación y degradación (12,13).

FIGURA 3.
Organización de los dominios del receptor de glucocorticoides.
NTD es el dominio NH2 terminal, contiene una secuencia de activación AF-1 que es dependiente del ligando. EL DBD es el dominio de unión al DNA y contiene dos regiones ricas en Zinc que son comunes a los factores de activación nuclear. El HBD es el dominio de unión al ligando y contiene una secuencia de activación AF-2 que es necesaria para la trascripción.

Acciones genómicas de los glucocorticoides

Una vez el complejo receptor ligando (GC/GCR), se ha translocado al núcleo, una de sus principales acciones consiste en la interacción con factores de transcripción lo que conduce a una inhibición en la expresión de proteínas, mecanismo conocido como transrepresión Figura 4. De otra parte, el GC/GCR estimula la síntesis de otras proteí-

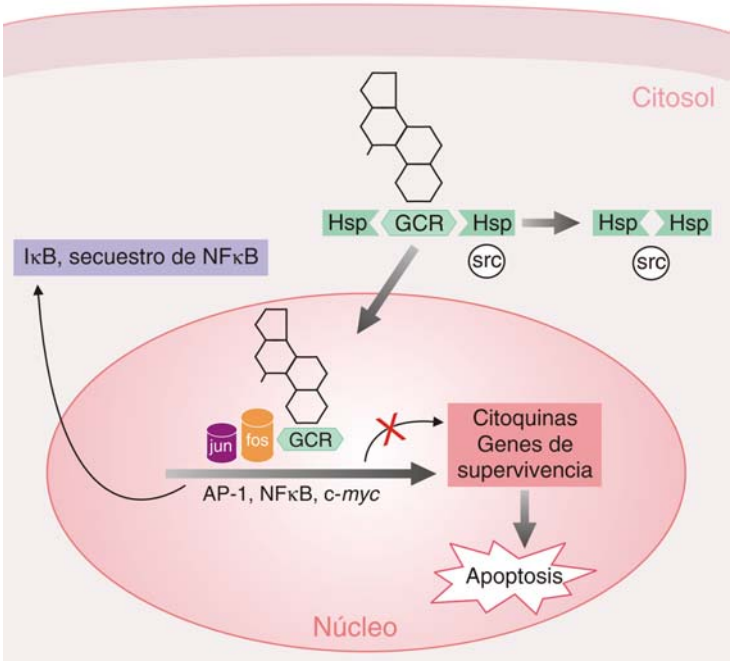


FIGURA 4.
Interacciones con factores de activación nuclear, y papel en la apoptosis de los GC.

Tabla 1. Efectos genómicos y no genómicos.

Mecanismo genómico y no genómico	Acción en el sistema inmune	Implicación clínica/terapéutica
Interacción con NFκB (Transrepresión)	Inhibición de la expresión de TNFα IL-1β, IL-2, IL-6, IFNγ. Inhibición de moléculas de adhesión ELAM, ICAM.	Antiinflamatorio, utilidad en AR y otras enfermedades autoinmunes, Enfermedad intestinal inflamatoria.
	Inducción de apoptosis	Terapias Antineoplásicas
Interacción con AP-1 (Transrepresión)	Inhibición de moléculas de adhesión, citoquinas. Inducción de apoptosis	Acción antiinflamatoria Acción antitumoral
Interacción con *C myc* (Transrepresión)	Inducción de apoptosis	Acción antitumoral
GC/GCR (Transactivación)	Inducción de síntesis de lipocortina. Inducción de anexina V	Antiinflamatorio, utilidad en asma por inhibición de leucotrienos.
Interacción post-transcripcional	Inhibición de fosfolipasa A2 Inducción de la síntesis de ONS endotelial. Activación de fosfatidil inositol 3 kinasa, proteína kinasa 3	Efecto protector cardiovascular? Efecto rápido a dosis altas
Interacción con el transporte de cationes transmembrana.	Inhibición del transporte de calcio y sodio. Inhibición de la transducción vía calcio/calmodulina.	Efecto antiinflamatorio rápido con dosis altas. Condiciones atentatorias de la vida: lupus nefritis, vasculitis sistémicas, vasculitis de SNC, hemorragia pulmonar, Trombocitopenia autoinmune.

nas actuando como factor de transcripción positivo induciendo la síntesis de DNA para algunas proteínas inhibitorias de la inflamación (10).

El NFκB es un factor de transcripción que activa genes que codifican para citoquinas, receptores de citoquinas, proteínas quimiotácticas y moléculas de adhesión (14). El NFκB, permanece secuestrado en una forma inactiva en el citoplasma por acción de su inhibidor el IκB hasta que es activado por señales tales como TNFα, infecciones, UV o infecciones virales, tal activación induce la liberación de NFκB de su inhibidor y su translocación al núcleo en donde induce la transcripción de diversos genes (14). Los GC pueden entonces inhibir la expresión de muchas moléculas inmunorreguladoras y citoquinas inflamatorias a través de la interacción con este importante factor de transcripción. Varios mecanismos se han propuesto para explicar la acción de los GC sobre este factor de activación. En primer lugar, aunque el GC/GCR no inhibe la síntesis de NFκB, puede inducir la síntesis de IκB lo cual hace que permanezca en el citoplasma (15). Un segundo modelo consiste en la interacción proteína-proteína que genera la represión de NFκB por GC/GCR lo que podría causar un enmascaramiento mutuo de los dominios de transactivación y de inducción de modificaciones postranslacionales. Y por último, un tercer modelo predice que la competencia por una cantidad limitada de proteínas coactivadoras las cuales median la actividad transcripcional y la actividad de ambos factores nucleares llevaría en consecuencia a la inactivación de NFκB (16).

Otro blanco importante para la transrepresión es el factor de transcripción AP-1, un complejo núcleo-protéico que media las respuestas celulares a potentes promotores tumorales. Muchas señales de transducción convergen en AP-1 y llevan a su activación. AP-1 ha sido involucrado en los procesos proliferación celular y puede ser regulado negativamente por los GC y otros supresores tumorales (17). Parece entonces lógico afirmar que este mecanismo de regulación explicaría en parte la muerte celular programada inducida por GC (18). Algunos experimentos indican que la interacción entre GC/GCR y AP-1 produce un bloqueo mutuo de las capacidades de transactivación de ambas (19).

El *c-myc* es un importante factor de transcripción que se ha sido encontrado asociado a una gran variedad de tumores, existen algunos estudios que han demostrado que la expresión sostenida de *c-myc* confiere resistencia a la apoptosis inducida por GC (20).

Los GC pueden actuar también a través de mecanismos postranscripcionales y postranslacionales, el mejor ejemplo, es tal vez, la reducción del los niveles de RNA mensajero (21). Las consecuencias de la actividad genómica de los GC quedan resumidas en la Tabla 1.

Acciones no genómicas de los glucocorticoides

Algunas acciones de los GC ocurren en unos pocos minutos o segundos, lo que no puede explicarse por medio de los mecanismos de transactivación o transrepresión, los mecanismos no genómicos son los responsables de este tipo de acción (22).

En forma muy interesante, se ha observado que la activación de fosfolipasa A2 (FA2) y la secreción de ácido araquidónico mediante la activación de factor de crecimiento epidérmico, es eficazmente inhibida por la acción de dexametasona; efecto que puede ser explicado por la ocupación de GCR pero no por acción transcripcional, dado que éste efecto ocurre sólo en pocos minutos y con dosis altas de GC. Uno de los mecanismos propuestos para

explicar tal acción es la liberación de alguna de las moléculas cochaperonas que pueden bloquear postranscripcionalmente la activación de FA2 (23). Tal mecanismo podría actuar no sólo en forma negativa, sino también en forma positiva activando post-transcripcionalmente la síntesis de óxido nítrico sintetasa endotelial, proteína kinasa Akt y fosfatidil inositol, efecto que puede ser protector cardiovascular (24).

Se sabe que los receptores de GC se copan cuando se utilizan dosis muy altas de GC, es decir, mayores a 100 mg. en equivalente a prednisolona al día, lo cual haría que las acciones clínicas en ausencia de receptores fuera irrelevante; no obstante, los GC pueden intercalarse en las membranas celulares alterando el transporte de cationes a través de la membrana plasmática, el resultado es la inhibición de los ciclos de transporte de calcio y sodio lo que contribuye a una rápida disminución de la actividad inflamatoria (25, 26) (Figura 2).

Un tercer mecanismo de acción no genómica específica, tiene que ver con la demostración en años recientes de la existencia de receptores de GC unidos a membrana plasmática de mononucleares humanos; es de anotar, que dichos receptores ya se habían demostrado en cerebros de anfibios y en líneas tumorales linfoma/leucemia (27). Los receptores de GCR unidos a membrana pueden incrementarse mediante estímulo con lipopolisacárido y pueden disminuirse con brifeldina A, un inhibidor de la vía secretoria; en artritis reumatoide, los receptores de GC unidos a membrana, se aumentan con la actividad de la enfermedad (22,28). Sin embargo permanece aún sin dilucidarse el papel específico de tales receptores en la membrana celular (22).

Mecanismos de regulación de la acción de GC

La regulación de la biodisponibilidad de los GC es un mecanismo necesario para mantener la integridad del sistema inmune, los efectos reguladores están a cargo de hormonas y citoquinas. El MIF es un producto hormonal secretado por la hipófisis y también por los macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios y a las bajas concentraciones de GC. El MIF regula los efectos inmunosupresores de GC mediante el incremento en la síntesis de FA2 y a proliferación celular, el MIF también regula la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T (LT) (29,30).

La prolactina, igual que el MIF es secretada por la hipófisis y está relacionada estructuralmente con la familia de eritropoyetina, GM CSF e IL-2. La prolactina es un comitógeno para linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) y es una activadora de natural de células NK y puede también incrementar la secreción de IL-2 y el receptor de IL-2 (IL-2R) (31,32).

Consecuencias inmunológicas del uso de glucocorticoides

Los efectos inmunosupresor y anti-inflamatorio de los GC son el resultado de la acción genómica y no genómica de éstos en diversos tipos celulares. Los GC causan linfopenia, monocitopenia, neutrofilia y reducen la respuesta de los LT a IL-1, son inhibidores la proliferación y activación de LB lo que genera una disminución en la síntesis de inmunoglobulinas (33). Los GC tienen efectos inhibitorios sobre diversas citoquinas como IL-1, IL-2, IL-3, TNFα, INFγ (33, 34). Los GC pueden inhibir la exudación plasmática y la secreción mucosa en las vías aéreas y reducir el número de mastocitos, macrófagos, LT y eosinófilos en las vías aéreas (35,36). Un resumen sobre las diversas acciones de los GC en las células del sistema inmune queda resumido en la Tabla 2.

Aplicaciones clínicas de los GC

En 1948, una mujer de 28 años con artritis reumatoide (AR), se convirtió en la primera persona tratada con GC y el resultado fue sorprendente y aun milagroso. La es-

Tabla 2. Efectos de los glucocorticoides sobre las células implicadas en la respuesta inmune.

Tipo celular	Efecto
Células endoteliales	Inhibición de la expresión de ICAM-1, ELAM-1, TNFα, IL-1,IL-6. ↓ óxido nítrico, metabolitos del ácido araquidónico, angiogénesis, ↓ endotelina 1.
Monocitos, macrófagos y neutrófilos	↓ aniones súper-óxido, ↓ quimiotaxis, adhesión y fagocitosis. ↑ lipocortina, lipomodulina y macrocortina. ↓ la presentación antigénica. Inhibición de citoquinas
Eosinófilos	↓ migración celular
Linfocitos	Linfopenia por redistribución ↓ de IL-2, INFγ y señales de transducción. ↑ de apoptosis y en consecuencia, ↓ de linfopoyesis. ↓ actividad de NK ↓ síntesis de inmunoglobulinas en los LB
Fibroblastos	↓ síntesis de proteínas, metaloproteinasas.
Hueso	↓ actividad osteoblástica y ↑ de la actividad osteoclástica
Músculo	Atrofia inducida por esteroides
Sinovia	Síntesis disminuida de colagenasas, molécula de adhesión y hialuronato.

Adaptada de: Morreland W and James RO. Glucocorticoids and rheumatoid arthritis. Back to the future. Arthritis&Rheumatism. 2002;10:2553-63.

Tabla 3. Equivalencias entre los glucocorticoides.

Drogas	Duración de acción (horas)	Potencia GC	Potencia MC	Dosis equivalente
Acción corta				
Cortisol (hidrocortisona)	8-12	1	1	20
Cortisona	8-12	0.8	0.8	25
Acción intermedia				
Prednisona	12-36	4	0.8	5
Prednisolona	12-36	4	0.8	5
Metil-prednisolona	12-36	5	0.5	4
Larga acción				
Dexametasona	36-72	25-30	0	0.7

Adaptado de: Axerold R. Glucocorticoid theraphy. Medicine 1976;55:39.

cogencia de un paciente con AR, no fue accidental, ya que 50 años atrás, muchos investigadores consideraban que en esta enfermedad existía un déficit de GC; sin embargo, no tardaron en aparecer efectos adversos relacionados a la dosis de GC que generaron la ruptura del entusiasmo inicial en su utilización (36). No obstante, en la actualidad, los GC se utilizan para tratar una gran variedad de condiciones inflamatorias entre las cuales se encuentran: el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades renales idiopáticas, y entidades autoinmunes diversas incluidas las del tejido conectivo. Los GC son, además, utilizados como parte de los regímenes de terapia inmunosupresora para prevenir el rechazo de transplantes, en la inducción de quimioterapias anti-neoplásicas y en condiciones graves atentatorias de la vida como el trauma raquimedular y en edema cerebral.

La utilización de los GC como medicamentos precisa estimar la dosis necesaria (Tablas 3 y 4) y el manejo apropiado de las diversas presentaciones y vías de administración; así como un conocimiento profundo de los efectos adversos relacionados. La Tabla 3 ilustra las equivalencias entre los GC más utilizados en cuanto a potencia y duración de acción. El concepto de equivalencia es importante para determinar las dosis y predecir los posibles efectos adversos.

Un ejemplo de la utilización práctica de GC se puede ver en un modelo de tratamiento de AR. Existe un suficiente cuerpo de evidencia de que las dosis bajas de GC son efectivas en el corto plazo en el alivio de los signos y síntomas de AR (38,39). Sin embargo, la AR es una enfermedad crónica cuyos principales desenlaces son evaluados a largo plazo, es decir las implicaciones que tiene la actividad inflamatoria sobre el desarrollo de lesiones articulares y la progresión radiológica. En tal sentido, los primeros estudios llevados a cabo demostraban que prednisolona a la dosis media de 13.5 mg/día comparada con aspirina no sólo produjo un alivio sintomático, sino que también demostró reducción en la progresión radiológica. (40,41).

Los conocidos efectos adversos de la terapia con GC limitan su utilización en patologías crónicas tales como AR; sin embargo, es difícil estimar si los efectos pueden atribuirse a la utilización de éstos o si son consecuencia de un estímulo inflamatorio persistente, sin embargo, los 50 años de experiencia en su utilización han evidenciado diversos efectos tóxicos definitivamente relacionados a los GC (37).

Entre los efectos inmediatos de los GC están la retención hidrosalina, ganancia de peso, hipertensión, incremento de la presión en la cámara anterior ocular y trastornos del estado de ánimo y entre sus efectos a largo plazo se cuentan, entre otras: osteoporosis, cataratas, anormalidades en el perfil lipídico y supresión adrenal.

Tabla 4. Terminología para estimación de las dosis de GC.

Bajas dosis	< ó = 7.5 mg de prednisolona o su equivalente/día
Dosis intermedias	> 7.5 mg hasta 30 mg de prednisolona o su equivalente /día
Dosis altas	> 30 mg hasta 100 mg de prednisolona o su equivalente/día
Dosis muy altas	> 100 mg de prednisolona o su equivalente /día
Pulso-terapia	Más de 250 mg en períodos cortos intravenosos

Adaptada de: Jacobs J.W. Bijlsma J.W. Glucocorticoid theraphy. Kelley's textbook of rheumatology. 2005; seventh edition.

Predisposición a infecciones

Diversas infecciones bacterianas, virales y por hongos están relacionadas al uso de terapia crónica con GC. En estudios epidemiológicos, se ha observado que las infecciones se incrementan sólo levemente cuando se dan dosis bajas de GC, mientras que cuando se utilizan dosis entre 20 y 40 mg/día el riesgo de infección puede ser muy significativo (riesgo relativo RR entre 1.3-3) (43).

Efectos en el metabolismo óseo

Los GC disminuyen la masa ósea en forma directa al inhibir la formación de hueso, y en forma indirecta al inhibir la secreción de andrógenos en el sistema hipófisis/adrenal y gonadal y al limitar la absorción de calcio en el intestino y disminuir su reabsorción en el riñón (44). La

terapia oral con GC es una causa bien establecida de osteoporosis con un incremento en el riesgo de fracturas vertebrales y de cadera (45,46). Es importante que los médicos instruyan a los pacientes sobre el riesgo de osteoporosis y en algunos casos realizar intervenciones farmacológicas preventivas con calcio y vitamina D, reemplazo hormonal y fármacos antiresorptivos (47, 48).

Efectos en el sistema cardiovascular

El uso crónico, aun con dosis bajas de GC, está asociado con retención hidrosalina y con hipertensión arterial, puede además promover el desarrollo de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y el desarrollo temprano de arteriosclerosis, todos los cuales son conocidos como importantes factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria. (49-51)

Cataratas

El tratamiento a largo plazo con GC orales incrementa el riesgo de cataratas subcapsulares posteriores, existe una correlación bien establecida entre la dosis diaria y la duración de la terapia con GC. Es necesario que los pacientes acudan a evaluaciones oftalmológicas periódicas (52).

Efectos gastrointestinales

Aunque no son efectos comunes, la utilización a largo plazo de GC se ha visto asociada con ulceras, pancreatitis y perforaciones intestinales, algunos autores han cuestionado el uso concomitante de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como un posible efecto sumatorio de ambos medicamentos y hay estudios que así lo demuestran en donde se ha visto un incremento entre 2 y 4 veces cuando se usan en forma simultánea ambas medicaciones (53-56).

Un resumen básico de los efectos adversos relacionados con el uso de GC queda ilustrado en la Tabla 5.

Conclusiones

El estudio de los mecanismos de acción de GC resulta ser un tema fascinante que conduce al clínico a la revisión de aspectos básicos de la inmunología de la inflamación y al entendimiento de los procesos patogénicos que llevan a usarlos como antagonistas de las patologías inflamatorias. Los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los GC se derivan de la interacción de una red de señales intracelulares extremadamente compleja de cuya comprensión se derivan las consideraciones terapéuticas. Los GC son medicamentos muy efectivos, pero dados sus potenciales efectos adversos, deben ser utilizados con precaución y con un adecuado conocimiento de sus efectos tanto benéficos como adversos.

Tabla 5. Principales efectos adversos de los glucocorticoides.

Sistema comprometido	Efecto adverso
Endocrino	Hipertrigliceridemia, diabetes mellitus
	Hipokalemia, alcalosis metabólica
	Hiperparatiroidismo, hipocalcemia
	Insuficiencia adrenal
Sistema inmune	Predisposición a infecciones
Piel	Atrofia cutánea, fascies de luna, acné, hirsutismo.
	Retardo en la cicatrización
Gastrointestinal	Úlcera péptica, pancreatitis, perforación intestinal
	Hígado graso
Neuro-psicológico	Insomnio, depresión, psicosis por GC, labilidad emocional
	Pseudotumor cerebri
Cardiovascular	Hipertensión, arteriosclerosis prematura
	Enfermedad coronaria
Musculoesquelético	Osteoporosis, osteonecrosis, fracturas
	Miopatía esteroidea
Ojos	Incremento de presión intraocular
	Cataratas subcapsulares

Referencias

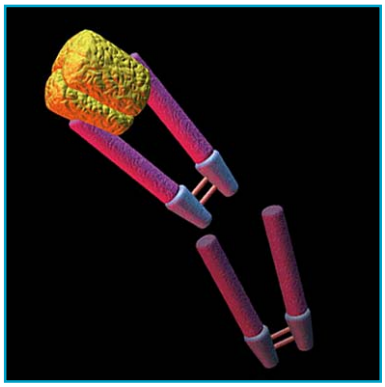
1. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharm Ther 2002;96:23–43
2. Ramsey-Goldman R. Missed opportunities in physician management of glucocorticoid-induced osteoporosis? Arthritis Rheum 2002;46: 3115–20
3. Walsh LJ, Wong CA, Pringle M, et al. Use of oralcorticosteroids in the community and the prevention of secondary osteoporosis: a cross section study. Br Med J 1996;313:344–6
4. Gaynon PS, Carrel AL. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Adv Exp Med Biol 1999; 457: 593–605
5. Moalli PA, Rosen ST. Glucocorticoid receptors and resistance to glucocorticoids in hematologic malignancies. Leuk. Lymphoma, 1994;15: 363–374
6. Adcock IM, Lane SJ. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation: corticosteroid-insensitive asthma, molecular mechanisms. J Endocrinol 2003;178:347–55
7. Almawi WY. Molecular mechanisms of glucocorticoid effects. Mod Asp Immunobiol 2001;2:78–82
8. Pei, L. Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. J. Biol. Chem1996; 271: 20879–20884
9. Moalli PA, Pillay S, Weiner D, et al. A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. Blood 1992;79: 213–222
10. Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Annu Rev Genet 1985;19: 209–252
11. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld GM, et al. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. Cell 1986;46:645–652
12. McLaughlin SH, Jackson SE. Folding and stability of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor. Prot Sci 2002;11: 1926–36
13. Pratt WB. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med 1998;217:420–34

14. Unlap T, Jope RS. Inhibition of NF-B DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain. Neurosci Lett 1995;198:41–44
15. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NFκB activity through induction of IêB synthesis. Science (Wash. DC) 1995;270: 286–290
16. De Bosscher K, Van den Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. J Neuroimmunol 2000; 109: 16–22
17. Herrlich P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. Oncogene 2001;20: 2465–2475
18. Stephanie GS, Kulsoom GK, Krett NL, et al. Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. Clin Cancer Res 2002;8: 1681–1694
19. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Anti-tumor promotion and anti-inflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell 1990;62:1189–1204
20. Astier A, Avraham H, Manie SN, et al. The related adhesion focal tyrosine kinase differentially phosphorylates p130Cas and the Cas-like protein, p105HEF1. J Biol Chem1997; 272: 19719–19724
21. Sanden S, Tripmacher R, Weltrich R, et al. Glucocorticoid dose dependent downregulation of glucocorticoid receptors in patients with rheumatic diseases. J Rheumatol 2000;27:1265–70
22. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, et al. Glucocorticoids in the Treatment of Rheumatic Diseases An Update on the Mechanisms of Action. Arthritis Rheum 2004; 11: 3408–3417
23. Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. Br J Pharmacol 2000;130:289–98
24. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang E, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nat Med 2002;8: 473–9
25. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids 2002;67:529–34
26. Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: glucocorticoid treatment of rheumatic diseases revisited. Arthritis Rheum 1998;41:761–7
27. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal peripheral blood mononuclear cells and upregulated following in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J 2004;18:70–80
28. Kunkel D. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal peripheral blood mononuclear cells and upregulated following in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J 2004;18:70–80
29. Calandra T, Bucala R. Maccrophage inhibitory factor: a glucocorticoid counter regulator within the immune system. Crit Rev Immunnol 1997: 17:77-88
30. Bacher M, Metz CN, Calandra T, et al. An essential regulatory role for macrophage inhibitory factor in T cell activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:7849-54
31. Clevenger CV, Altmann SW, Prystowsky MB. Requirement of nuclear prolactin for interlukin 2 stimulated proliferation of T lynphoocytes. Science 1991;253:77-9
32. Matera L, Cesano A, Belline G, et al. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen activity of T, B and NK lymphocytes. Brain Behav immune 1992; 6:409-17
33. Meuleman J, Katz P. The immunologic effects, kinetics, and use of glucocorticosteroids. Med Clin North Am 1985;69: 805-16
34. Chen CC, Sun YT, Chen JJ, et al. TNF-alphainduced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. J Immunol 2000;165:2719- 28
35. Boschetto P, Rogers DF, Fabbri LM, et al. Corticosteroid inhibition of airway microvascular leakage. Am Rev Respir Dis 1991;143:605-9
36. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, et al. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. Am Rev Respir Dis 1992;145:669-74
37. Moreland L O'Dell J. Glucocorticoids and Rheumatoid artritis back to the future? Arthritis Rheum 2002;46:2553–2563
38. Gotzsche PC, Johansen HK. Meta-analysis of short term low dose prednisolone versus placebo and non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis. BMJ 1998;316:811–8
39. Saag KG, Criswell LA, Sems KM, et al. Low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of their moderate-term effectiveness. Arthritis Rheum 1996;39: 1818–25
40. Joint Committee of the Medical Research Council and Nuffield Foundation on Clinical Trials of Cortisone A, and Other Therapeutic Measures in Chronic Rheumatic Diseases. A comparison of cortisone and aspirin in the early cases of rheumatoid arthritis. BMJ 1954;1:1223–7
41. Joint Committee of the Medical Research Council and Nuffield Foundation on Clinical Trials of Cortisone A, and Other Therapeutic Measures in Chronic Rheumatic Diseases. A comparison of prednisolone with aspirin or other analgesics in the treatment of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1959;18:173–87
42. Kirwan JR, the Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 1995;333: 142–6
43. Stuck AE, Minder CE, Frey FJ. Risk of infectious complications in patients taking glucocorticosteroids. Rev Infect Dis 1989;11:954-963
44. Hosking DJ. Effects of corticosteroids on bone turnover. Respir Med 1993; 87:Suppl A:15-21
45. Laan RFJ, van Riel PLCM, van de Putte LBA, et al. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. Ann Intern Med 1993; 119:963–8
46. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, et al. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. J Bone Miner Res 2000;15:993–1000
47. Solomon DH, Katz J, Jacobs JP, et al. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. rates and predictors of care in an academic rheumatology practice. Arthritis Rheum 2002;46:3136–3142
48. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 2001 update. Arthritis Rheum 2001;44:1496–503
49. Jackson SHD, Beevers DG, Myers K. Does long-term low-dose corticosteroid therapy cause hypertension? Clin Sci (Lond) 1981; 61: 381s–383s
50. Kalbak K. Incidence of arteriosclerosis in patients with rheumatoid arthritis receiving long-term corticosteroid therapy. Ann Rheum Dis 1972;31:196–200
51. Lieberman P, Patterson R, Kunske R. Complications of longterm steroid therapy for asthma. J Allergy Clin Immunol 1972;49:329–36
52. Toogood JH, Markov AE, Baskerville J, et al. Association of ocular cataracts with inhaled and oral steroid therapy during long-term treatment of asthma. J Allergy Clin Immunol 1993;91:571-9
53. Messer J, Reitman B, Sacks HS, et al. Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. N Engl J Med 1983;309: 21–4
54. Nelp WB. Acute pancreatitis associated with steroid therapy. Arch Intern Med 1961;108:702–10
55. Sterioff S, Orringer M, Cameron J. Colon perforations associated with steroid therapy. Surgery 1974;75:56–8
56. Hansen M, Podenphant J, Florescu A, et al. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Ann Intern Med 1991;115:787–96

33

TERAPIA ANTI-TNF: BASES MOLECULARES Y UTILIDAD CLÍNICA

Claudio Galarza M.
Ricardo Pineda-Tamayo
Luis Zurita G.
Mario García-Carrasco
Jorge Rojas S.
Juan-Manuel Anaya



Contenido

Propiedades inflamatorias del TNFα
Papel del TNFα en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias
Inhibición del TNFα
Etanercept
Infliximab
Adalimumab
Indicaciones de los anti-TNFα
Efectos adversos

El TNFα es una citoquina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos, que participa en la patogénesis de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias. En el presente capítulo se describen las bases moleculares de esta citoquina y los agentes biológicos utilizados actualmente para bloquearla.

Introducción

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) es una citoquina aislada hace ya más de 25 años. La descripción inicial acerca de las funciones de TNFα se realizó sobre la base de su habilidad para inducir muerte de células tumorales *in vitro* y de causar necrosis hemorrágica en tejidos transplantados (1). En años posteriores se describió su rol como un potente agente proinflamatorio, su función central en el shock endotóxico y en otras actividades biológicas, por lo que se convirtió en blanco terapéutico (2-4). En la actualidad existe suficiente evidencia del papel de esta citoquina en diversos procesos patológicos inflamatorios, infecciosos y autoinmunes (5-8). En el presente capítulo se describen los mecanismos de inflamación y daño inducido por su sobreproducción y, utilizando como modelo básico la artritis reumatoide (AR), se analizan los medicamentos biológicos anti-TNFα desarrollados en años recientes para el control de sus efectos.

Propiedades inflamatorias del TNFα

El TNFα y linfotoxina α, también conocida como TNFβ son citoquinas pertenecientes a la superfamilia de ligandos que activan un grupo de receptores estructuralmente análogos. Todos los miembros de esta superfamilia, excepto linfotoxina α, son proteínas compuestas de tres cadenas polipeptídicas, las cuales conforman tres subunidades idénticas. TNFα y β ligan con similar afinidad a dos receptores de 55 kd y 75 kd. Esta unión al receptor es el inicio de una cascada de eventos intracelulares que terminan con la regulación de diversos genes determinantes de muchas funciones biológicas, entre otras: estímulos para la proliferación de linfocitos T (LT), proliferación celular, resorción ósea, lisis tumoral, fiebre, e incremento en la síntesis de reactantes de fase aguda en el hígado entre otras (9).

El TNFα se produce principalmente en los monocitos y los macrófagos, pero también en linfocitos B (LB), LT, y en los fibroblastos. Actúa como un potente inductor paracrino estimulando la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias en especial IL-1, IL-6, IL-8 y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (10-12). Además, promueve la síntesis de moléculas de adhesión por parte de los fibroblastos y células endoteliales lo que resulta en un incremento de la adhesión y migración celular a los sitios de inflamación (13). El TNFα es capaz de reproducir todo el fenómeno de respuesta inflamatoria observado en el shock séptico inducido por endotoxinas bacterianas y, de hecho, sus niveles sanguíneos se encuentran aumentados en la sepsis severa (14-15).

Los proceso de muerte celular programada o apoptosis también cuenta con la acción del TNF-α, ese fenómeno ocurre durante la producción sistémica o local del TNF-α en procesos de crecimiento y desarrollo normales, sin embargo en algunos momentos puede convertirse en una reacción celular patológica inducida por esta citoquina. Igualmente, el proceso de apoptosis mediado por TNFα tiene un papel importante en la actividad tumoricida que ejerce la citoquina (16).

Papel del TNFα en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias

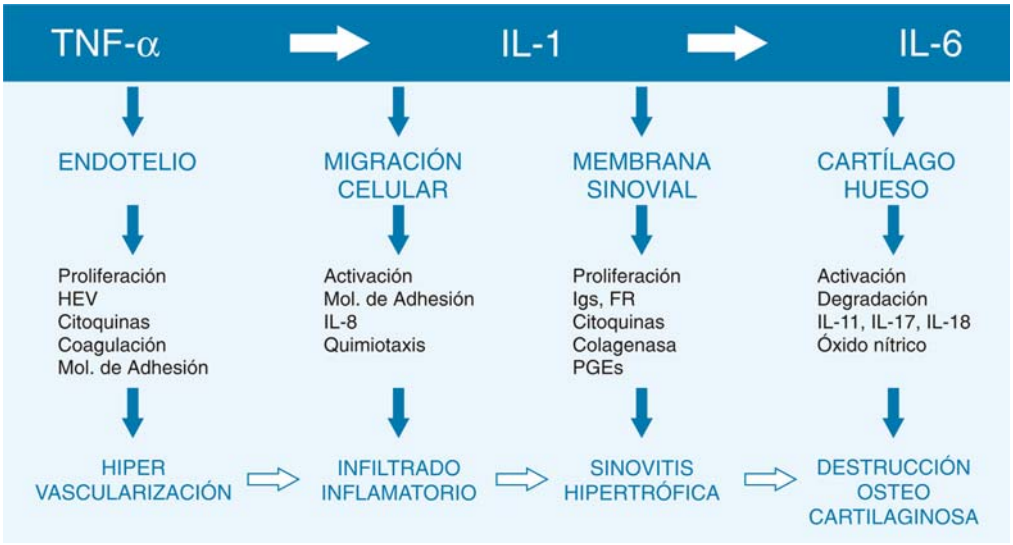
La AR es una enfermedad crónica inflamatoria y autoinmune de etiología desconocida, caracterizada por inflamación y proliferación sinovial, destrucción del cartílago articular y del hueso subcondral que conduce a la pérdida de la función articular (17). El TNFα ha sido identificado en la membrana sinovial y en el *pannus* articular de los pacientes con AR (18). In vitro induce la resorción del cartílago y de hueso, la síntesis de Prostaglandina E2 y de colagenasas por parte de las células sinoviales y, como se mencionó, también promueve la síntesis de moléculas de adhesión (19-21). En la membrana sinovial reumatoide, el TNFα transforma la naturaleza de los fibroblastos sinoviales en una célula con un inmenso potencial invasivo sobre el cartílago y el hueso (22,23) (Figura 1). Por lo tanto, esta citoquina es un blanco terapéutico muy importante, por lo que se desarrollaron, inicialmente en modelos murinos, anticuerpos monoclonales o policlonales contra ella y receptores solubles que redujeron en forma significativa su actividad en la artritis (24-26).

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) son dos enfermedades inflamatorias intestinales, idiopáticas con una expresión clínica muy similar pero con mecanismos patogénicos diferentes. La EC es un tipo de colitis que causa ulceración de la mucosa intestinal y abscesos; en su patogénesis se han implicado algunos factores medioambientales como el consumo de cigarrillo y el estilo de vida y agentes infecciosos como *Mycobacterium paratuberculosis*. Una sobreexpresión de TNF ha sido identificada en la lamina propia, profunda y submucosa intestinal de los pacientes con EC (27,28). Tal sobreexpresión puede ser el reflejo de un imbalance en el perfil de citoquinas con predominio de Th1. Los modelos animales de reducción de inflamación han servido para proponer estudios posteriores sobre la utilidad de bloquear el TNFα en la EC (29,30). El papel del TNF en la EC resulta en la activación del endotelio, inducción de quimioquinas y reclutamiento de neutrófilos en la mucosa intestinal; además de alteración de la permeabilidad, crecimiento de la mucosa intestinal e inducción de apoptosis (31-33).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad degenerativa primaria del sistema nervioso central (SNC). El TNFα se encuentra aumentado en el suero, en el líquido cefalorraquídeo y en el infiltrado inflamatorio de los pacientes con EM (34,35). Además el TNF puede activar la actividad de los oligodendrocitos y está implicado en el proceso de desmielinización, además de que actúa como un perpetuador de la actividad inflamatoria local (35,37).

Las espondiloartropatías seronegativas son un grupo de desórdenes, caracterizados por inflamación de los sitios de inserción tendinosa y destrucción articular. El TNFα se ha visto implicado en la mediación de muchos de los eventos fisiopatogénicos y sus niveles séricos y sinoviales están aumentados en esta patología (ver Capítulo 31) (38-41).

FIGURA 1.
Papel del TNFα en artritis reumatoide.
MMP: metaloproteinasas; HEV: vénulas de endotelio alto; Igs: inmunoglobulinas (anticuerpos); FR: factor reumatoide; PGEs: prostaglandinas.



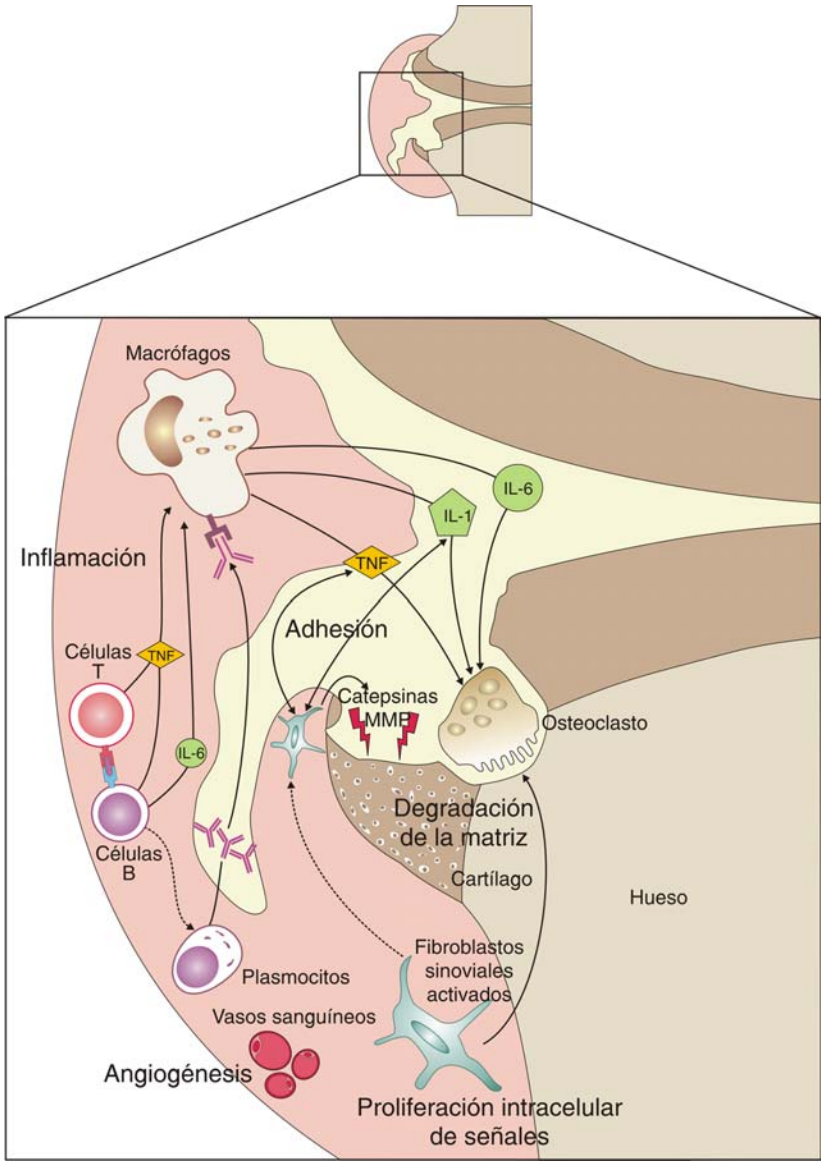


Tabla 1. Características de los agentes bloqueadores del TNFα.

Agente biológico	Tipo de acción	Forma de administración	Dosis recomendadas	Vida media
Etanercept	Receptor soluble recombinante liga TNFα y β	Subcutáneo	25 mg dos veces por semana	4 días
Infliximab	Anticuerpo quimérico anti TNFα	Infusión intravenosa	3 mg/kg, semanas 0, 2, 6, semanas después cada 8	9 días
Adalimumab	Anticuerpo humanizado anti TNFα	Subcutáneo	40 mg cada 2 semanas	2 semanas

Inhibición de las acciones del TNFα en la artritis reumatoide

Dos estrategias han sido desarrolladas para conseguir la inhibición del TNF; la creación de anticuerpos monoclonales contra el TNF humano y el uso de receptores solubles para el mismo (Tabla 1).

Etanercept

Aspectos generales

El etanercept (sTNF-RII:Fc, Enbrel®) es un receptor soluble tipo II del TNF desarrollado mediante tecnología recombinante. Tiene una estructura dimérica formada por dos porciones del receptor tipo II (p75) del TNF humano, unidos a la porción Fc de la IgG1, lo cual le proporciona una afinidad mayor al TNFα, que el receptor monomérico (42,43). El dímero además le brinda una vida media sérica mayor (4 días) e incrementa la afinidad de unión para el agregado trimolecular de TNF (42,43). Compite con el receptor de membrana por el TNFα y el TNFβ, inactivándolos. Además, modula indirectamente diversas respuestas biológicas mediante el control de moléculas que son inducidas o reguladas por el TNF, como la expresión de la E-selectina o los niveles séricos de IL-6 e IL-1, entre otras (42,43).

El etanercept se absorbe en forma lenta y alcanza sus máximas concentraciones en 50 horas. El régimen de dosificación de 25 mg subcutáneo dos veces por semana parece ser tan eficaz como 50 mg dos veces por semana (44). La administración concomitante de metotrexate (MTX) no altera su farmacocinética (42).

Estudios clínicos

Los resultados positivos de los estudios de fase I y II (45,46) crearon la necesidad de evaluar su eficacia en pacientes con AR refractaria a tratamientos con drogas modificadoras de la enfermedad (DMARD) (47,48). En un estudio fase III que duró seis meses, controlado con placebo (47), se comparó etanercept a dosis de 10 y 25 mg subcutáneo dos veces por semana. Los pacientes bajo el régimen de etanercept presentaron una mejoría rápida y sostenida. A los seis meses, 50% de los pacientes tratados con 25 mg de etanercept, alcanzaron un ACR 20 frente al 11% de los pacientes en el grupo de placebo; 40% alcanzaron un ACR50, comparado con sólo 5% del grupo placebo. La actividad funcional medida por el HAQ mostró una mejoría significativa En todas las pruebas controladas, las reacciones en el sitio de aplicación se encontraron en el 37% en el grupo de etanercept *versus* 10% en el grupo placebo.

Un estudio de seguimiento a 24 semanas, doble ciego, en 89 pacientes con AR activa a pesar de al menos 6 meses de tratamiento con MTX a dosis estables de 15 a 25 mg por semana, se asignó la administración de etanercept 25 mg dos veces por semana o placebo mientras continuaban recibiendo MTX. A la semana 24, 71% de los pacientes que recibieron etanercept presentaron una mejoría ACR20 comparado con el 21% de los pacientes que recibieron placebo. Además, los pacientes en el grupo de etanercept tuvieron una significativa mejoría en todas las otras medidas de desenlace de la AR (49). Estudios abiertos han mostrado que la su eficacia a largo plazo es sostenida sin la presencia de efectos adversos mayores (50).

El etanercept fue evaluado en pacientes con AR temprana (duración de la enfermedad menor a tres años) (51). El número de participantes fue de 632, divididos en tres regímenes terapéuticos por el lapso de 52 semanas: etanercept 10 mg y placebo en tabletas, etanercept 25 mg y placebo en tabletas, MTX con una dosis en escalada rápida desde 7,5 a 20 mg semanales (promedio 19 mg semanales) y placebo en inyecciones. El daño radiológico fue medido con el índice de Sharp modificado. Al final de la prueba, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la progresión radiológica en los diferentes grupos. Sin embargo, al analizar los resultados individualmente, etanercept 25 mg probó ser más eficaz, a nivel radiológico, que las dosis más bajas del mismo o que el MTX. Al cabo de 12 meses de estudio, 75% de los pacientes con etanercept 25 mg no presentaron nuevas erosiones comparado con el 57% del grupo MTX. Los pacientes de este estudio fueron seguidos adicionalmente por un periodo de 12 meses (51,52). 75% de los del grupo etanercept 25mg completaron los dos años de seguimiento vs. 58 % del grupo MTX. Un ACR 20 fue alcanzado por el 80% del grupo etanercept 25mg, contra un 63% en el grupo MTX. El seguimiento de estos pacientes en el tercer año, sugirió que el índice de progresión del daño articular es mas lento en pacientes que reciben etanercept (51,52) (Tabla 2).

El etanercept ha mostrado también ser efectivo en casos de artritis reumatoide juvenil (ARJ) (53). En un estudio aleatorizado, controlado con placebo en 51 pacientes con ARJ poliarticular, se administraron 0.4 mg por kilo de peso subcutáneos de etanercept dos veces por semana. Hubo una disminución significativa del número de articulaciones inflamadas, y los rangos de movimiento articulares se incrementaron en 80% en el grupo de tratado.

Tabla 2. Evidencia clínica del tratamiento con etanercept en AR.

Referencia/ tipo de estudio/ dosis de etanercept	Dosis de MTX	N	Media de la duración (años)	Medidas de desenlace y resultados
(48)/ ADCPC/ 0.25, 2, o 16 mg/m^2 dos veces por sem	0	180	5	ACR-20 a 12 sem: 75% (16 mg), 46% (2 mg), 33% (0.25 mg), 14% (placebo) ACR-50 a 12 sem: 57% (16 mg), 22% (2 mg), 9% (0.25 mg), 7% (placebo)
(47)/ ADCPC/10 o 25 dos veces por sem	0	234	12	ACR-20 a 24 sem: 59% (25 mg), 51% (10mg), 11% (placebo) ACR-50 a 24 sem: 40% (25 mg), 24% (10 mg), 5% (placebo) ACR-70 at 24 sem: 15% (25 mg), 9% (10mg), 1% (placebo)
(49)/ADCPC/25 mg vez por sem	19 mg/kg	89	13	ACR-20 a 24 sem: 71% (etanercept), 27% una (placebo) ACR-50 a 24 sem: 39% (etanercept), 3% (placebo) ACR-70 a 24 sem: 15% (etanercept), 0% (placebo)
(51,52)/ ADCPC/10 o 25 mg veces por sem, o MTX oral	19 mg/sem al grupo de MTX	632	1	ACR-20 a 24 meses: 72% (25 mg), etanercept 2 61% (10 mg), 59% (MTX) ACR-50 a 24 meses: 49% (25 mg), 35% (10 mg), 42% (MTX) ACR-70 a 24 meses: 29% (25 mg), 19% (10 mg), 24% (MTX) RX a 2 años: cambio en el índice de Sharp: 1.3 (25 mg), 3.2 (MTX)

ADCPC: aleatorizado doble ciego placebo controlado; Sem: semana; MTX: metotrexate; ACR: criterios de respuesta del colegio americano de reumatología.

Infliximab

Aspectos generales

El Infliximab (Remicade®) es una anticuerpo quimérico de tipo Ig1 anti-TNFα, cuya región constante es humana mientras que la región de unión al antígeno es murina. Liga el TNFα tanto en su forma soluble como el unido a la membrana celular, induce muerte celular en las células que expresan TNFα bien sea por medio de la acción del anticuerpo como por la vía de activación de complemento (54,55).

La experiencia inicial de su eficacia fue evaluada en un estudio abierto fase II/III realizado entre 1992 y 1994 (56). La dosis inicial fue de 20 mg por kg, extrapolada de las dosis utilizadas en modelos murinos de artritis inducida por colágeno, en los cuales los efectos antiinflamatorios y la protección que ejercía el anticuerpo monoclonal estaban bien establecidos (57).

La farmacocinética del infliximab varía entre pacientes (58). Algunos autores han sugerido que el acortamiento entre los intervalos de las dosis a cada seis semanas puede ser más efectivo clínicamente que el incremento en la dosis total del medicamento (58).

Estudios clínicos

En un estudio doble ciego, controlado con placebo, la administración de infliximab a 10 mg por kg rápidamente redujo el número de articulaciones inflamadas así como los niveles de proteína C reactiva (PCR) (58). El efecto clínico se registró en la primera semana de tratamiento. En las biopsias de membrana sinovial se observó una disminución significativa del número total de LT y de la expresión de moléculas de adhesión (59,60).

La dosis de 3 mg por kg en combinación con MTX resulta ser tan efectiva como 10 mg kg con o sin MTX (61,62). Los regimenes de infliximab más MTX han demostrado ser más eficaces que el uso de cualquiera de los dos como terapia única, tanto en la expresión clínica de la enfermedad como en la progresión radiológica de la AR (63). Además, la terapia simultánea con MTX parece no sólo aumentar la eficacia de infliximab sino también disminuir la inmunogenicidad generada por éste (61).

En estudios más recientes se ha evaluado la eficacia con dosis de 1, 5, 10 y 20 mg por kg; sin embargo, ha sido evidente que la enfermedad tiende a recaer después de la suspensión de la terapia (59,64). En la Tabla 3 se resumen los estudios clínicos sobre eficacia del infliximab.

Adalimumab

Aspectos generales

El adalimumab (Humira®) es un anticuerpo monoclonal humano del tipo IgG1 que liga específicamente el TNFα. Fue desarrollado en células de mamíferos, sin embargo tanto las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de las regiones variables de la inmunoglobulina son completamente humanizadas. El adalimumab consta de 1330 aminoácidos y su peso molecular aproximado es de 148 kD (65). Tiene la capacidad de inducir lisis de las células que expresan TNFα en su superficie; sin embargo, no es capaz de inactivar al TNFβ. Similar a la acción de otros agentes anti TNF, también modula la expresión de moléculas de

Tabla 3. Evidencia clínica del tratamiento con Infliximab en AR.

Referencia/tipo de estudio/ dosis de infliximab	Dosis de MTX	N	Media de duración (años)	Medidas de desenlace y resultados
(59) DC/0, 1, ó 10 mg/kg dosis	0	73	8	Paulus 20: 79% (10 mg), 44% (1 mg), 8% única (placebo)
(64) DC/ sem 0 (0, 5, 10, 20 mg/kg) Abierto/ sem: 12, 20, 28 (10 mg/kg)	10 mg/sem	28	6.2	ACR-20 a la sem 1: 86%(5 mg/kg), 71% (10 mg/kg), 86% (20 mg/kg), 14% (placebo) ACR-20 a la sem 40: 28% (10 mg/kg)
(61)ADCPC/1, 3, ó 10 mg/kg semanas 0, 2, 6, 10, 14	7.5 mg/sem	101	10	Paulus 20 s ls sem 14: 60% (3 mg or 10 mg/kg ± MTX) Paulus 20 sostenido a la sem 26 en 3 o 10 mg/kg +MTX grupo
(62) ADCPC/1, 3, ó 10 cada 4 u 8 sem	15 mg/kg	428	8.4	ACR-20 a 30 sem: 52% (infliximab), 20% mg/kg (placebo) ACR-50 a 30 sem: 28% (infliximab), 5% (placebo) ACR-70 a 30 sem: 12% (infliximab), 0% (placebo)
(63) ADCPC /3 ó 10 mg/kg cada 4 u 8 sem	16 mg/kg	428	9	RX a la sem 54 : Indice de Sharp cambió: 0.0 (infliximab), +4.0 (placebo)

DC: doble ciego; ADCPC: aleatorizado doble ciego placebo controlado; Sem: semana; MTX: metotrexate; ACR criterios de respuesta del colegio americano de reumatología.

adhesión, proteínas que degradan la matriz extracelular y los reactantes de fase aguda (66).

La dosis recomendada de adalimumab en el tratamiento de la AR es de 40 mg subcutáneos en una única inyección, cada dos semanas. Los incrementos de las dosis, como se verá más adelante no parecen ofrecer un beneficio clínico adicional (67). La biodisponibilidad del medicamentos es de alrededor 64%. La administración conjunta con MTX disminuye su depuración (67). Su absorción es lenta y el pico máximo de concentración se logra aproximadamente a las 130 horas.

Estudios clínicos

La administración de adalimumab cada semana a la dosis de 40 mg subcutáneo mostró ser tan eficaz como la administración cada dos semanas y las respuestas ACR20 resultaron mejores que el placebo (68). La adición de MTX a pacientes que tienen respuesta parcial ha demostrado beneficios en los pacientes con AR (69). De manera similar, la terapia combinada con MTX, en pacientes que tenían respuesta parcial al MTX, indica respuestas ACR20, 50 y 70 superiores a las obtenidas cuando se adiciona al MTX placebo (70).

El adalimumab ha sido evaluado como monoterapia en AR. En estos casos la eficacia de la administración semanal puede ser superior a la obtenida con administración quincenal (68,71). En la Tabla 4 se resumen los estudios clínicos sobre eficacia del adalimumab.

Indicaciones de los anti-TNFα

Los agentes anti-TNF están indicados en la terapéutica de la AR cuando hay fracaso al tratamiento adecuado con otro fármaco modificador de la enfermedad o pueden ser agregados a la terapia cuando la respuesta es insuficiente, también son eficaces utilizados como primera elección; sin embargo, sus costos altos limitan su utilización (72-74).

El infliximab y el etanercept son eficaces también en la artropatía psoriásica. Se recomienda su utilización cuando hay fracaso a la terapéutica estándar con AINES a dosis óptimas por al menos 3 meses y el fracaso a la utilización de MTX a dosis de 20 mg semanales (75-79).

El uso de AINES se considera el "gold standard" en el tratamiento de la espondilitis anquilosante (EA), dado que estos proporcionan un alivio en los síntomas y en los signos de la enfermedad; sin embargo, la mejoría sólo se presenta mientras el paciente sostiene la terapia con dichas medicaciones y suele recaer cuando son suspendidos. Se ha recomendado la utilización de los AINES a dosis máximas, sin embargo no siempre es posible llegar a las dosis óptimas de anti-inflamatorios, debido en gran parte a la toxicidad gastrointestinal de los mismos. Por otra parte éstos no tienen efecto modificador de la enfermedad. La sulfasalazina puede ser útil en el manejo del compromiso periférico pero no en el compromiso axial de la enfermedad. Ninguno de estos agentes parece tener una acción específica de regulación sobre los mecanismos del proceso fisiopatogénico de la EA en donde el TNFα juega un papel importante. Por lo tanto el uso de anti-TNF es recomendado en estos pacientes cuando los AINES no son suficientes para el control de la enfermedad, en cualquiera de sus formas (axial, entesopatía y compromiso periférico) (80-84).

Efectos adversos de los anti-TNFα

Infecciones

Los cuadros de exacerbación de una tuberculosis latente deben ser tenidos siempre en cuenta. El patrón de presentación puede ser atípico, como suele ocurrir en pacientes inmunosuprimidos, siendo las presentaciones miliares o extrapulmonares las más frecuentes. Los casos de tuberculosis han sido reportados con más frecuencia

en pacientes con infliximab que en aquellos con etanercept o adalimumab, en parte porque el sistema de reporte de efectos adversos para estos dos últimos agentes es voluntario. Se recomienda que todos los pacientes se evalúen previo inicio de tarapia anti-TNF con radiografía de tórax y una prueba de tuberculina (85-88).

Otras infecciones oportunistas pueden observarse, aunque su frecuencia es muy baja. No obstante, es importante tener en cuenta aquellas infecciones que dependen de la formación de granulomas como mecanismo de defensa del huésped tales como listeriosis, coccidioidomicosis e histoplasmosis (85,86,88).

Reacciones en el sitio de aplicación

Las reacciones en el sitio de aplicación se han reportado con más frecuencia en los agentes de uso subcutáneo y en ocasiones obliga a la suspensión del medicamento.

Malignidad

Los pacientes en tratamiento con anti-TNF tienen el doble de riesgo de desarrollar linfomas no-Hodgkin que la población general; sin embargo, se debe considerar que los pacientes con AR tienen también un elevado riesgo de malignidad (89). No hay evidencia acerca de la inducción de neoplasias diferentes a los linfomas no-Hodgkin ni de reactivación de neoplasias.

Reacciones autoinmunes

Algunos síndromes similares al lupus inducido por medicamentos pueden aparecer en el curso de una terapia con anti-TNF. Usualmente tales síntomas desaparecen una vez descontinuado el medicamento. A pesar de que los pacientes pueden desarrollar anticuerpos antinucleares, anti-DNA y anticardiolipinas el riesgo de lupus inducido por estos medicamentos es bajo (90-92).

Otros efectos adversos

Las dosis de infliximab de 10 mg/kg tiene riesgo de empeorar una falla cardíaca preexistente, sobre todo en pacientes con AR. El etanercept y el infliximab podrían incrementar la incidencia y la mortalidad por falla cardiaca congestiva, sin embargo la evidencia de este efecto no es alta (93,94).

Se han reportado algunos casos de anormalidades hematológicas graves como aplasia medular, y algunos pacientes pueden presentar anemia (94,95).

Otros agentes anti-TNFα

Otros agentes anti-TNFα en curso de investigación son el onercept, receptor soluble p55 del TNFα, (sTNF-RI); el lenercept, proteína de fusión recombinante con una estructura dimérica formada por dos porciones del receptor tipo I (p55) del TNF humano unidos a la porción Fc de la IgG1; y el pegsunercept (PEGsTNF/RI), receptor (p55) recombinante del TNFα.

Conclusión

El conocimiento de los mecanismos de inflamación en diversas patologías inflamatorias y autoinmunes ha conducido al desarrollo de nuevas terapias para regular el proceso de "caos homeostático" del sistema inmune. Los agentes anti-TNF representan un importante paso en este sentido. Su utilización ha abierto grandes perspectivas. No obstante, muchos interrogantes están por resolverse acerca del perfil de eficacia y seguridad en múltiples enfermedades. El tiempo y el trabajo científico los resolverá.

Tabla 4. Evidencia clínica del tratamiento con adalimumab en AR.

Referencia/tipo de estudio/ dosis de adalimumab	Dosis de MTX	N	Media de duración (años)	Medidas de desenlace y resultados
(71) ADCPC/20 o 40 mg cada semana o cada dos sem	0	544	11	ACR-20 a 26 sem: 53% (40 mg sem), 46% (40 mg c/2sem), 39% (20 mg sem), 36% (20 mg c/ 2sem), 19% (placebo) ACR-50 a 26 sem: 35% (40 mg sem), 22% 40 mg c72sem), 21% (20 mg sem), 19% (20 mg c/2 sem), 8% (placebo)
(69) ADCPC/20, 40, u 80 mg. cada dos sem	16.8 mg/sem	271	12	ACR-20 a 24 sem: 66% (80 mg), 66% (40 mg), 48% (20 mg), 15% (placebo) ACR-50 a 24 sem: 43% (80 mg), 54% (40 mg), 32% (20 mg), 8% (placebo) ACR-70 a24 sem: 19% (80 mg), 27% (40 mg), 1 0% (20 mg), 5% (placebo) Rx a 52 sem: cambio en índice de Sharp: 0.1 (40 mg), 0.8 (20 mg), 2.7 (placebo)
(70) ADCPC/40 mg cada dos sem o 20 mg cada semana	16.7 mg/sem	619	11	ACR-20 a 24 sem: 60% (40 mg), 55% (20 mg), 24% (placebo) ACR-50 a 24 sem: 41.5% (40 mg), 38% (20 mg), 9.5% (placebo) ACR-70 a 24 sem: 23% (40 mg), 21% (20 mg), 4.5% (placebo)

ADCPC: aleatorizado doble ciego placebo controlado; Sem: semana; MTX: metotrexate; ACR: criterios de respuesta del C.A.R.

Referencias

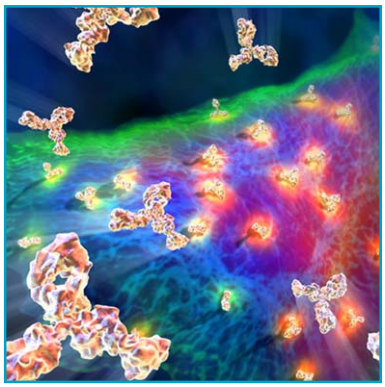
1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 1975;72:3666-70
2. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986;234:470-4
3. Beutler B, ed. Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine. New York: Raven Press, 1992
4. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. Science 1985;229:869-71
5. Powrie F, Lesch MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4 T cells. Immunity 1994; 1:553- 62
6. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-β-mediated oral tolerance. J Exp Med 1996;183:2605-1979; 77:843-6
7. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest 1993;91:1390-5
8. MacDonald TT, Hutchings P, Choy M-Y, Murch S, Cooke A. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. Clin Exp Immunol 1990;81:301-5
9. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Eng J Med 1996;334:1717-25
10. Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. J Exp Med 1986;163:1363-75
11. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures: comparison of monoclonal anti TNF-a antibody with interleukin-1 receptor antagonist. Eur Cytokine Netw 1995;6:225-30
12. Correa PA, Anaya JM. Bases moleculares para el estudio del TNF alfa en la artritis reumatoidea Rev Colomb Reumatol 2001;8:236-50. http://www.encolombia.com/medicina/reumatologia/reuma82-01-bases.htm
13. Chin JE, Winterrowd GE, Krzesicki RF, Sanders ME. Role of cytokines in inflammatory synovitis: the coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 1990;33:1776-86
14. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ III, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. Surg Gynecol Obstet 1987;164:415-22
15. Bauss F, Droge W, Mannel DN. Tumor necrosis factor mediates endotoxic effects in mice. Infect Immun 1987;55:1622-5
16. De Freitas, I., Fernandez-Somoza, M., Essenfeld-Sekler, E., Cardier, J. E. (2004). Serum Levels of the Apoptosis-Associated Molecules, Tumor Necrosis Factor-a/Tumor Necrosis Factor Type-I Receptor and Fas/FasL, in Sepsis. Chest 125: 2238-2246
17. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. N Engl J Med 1990;322:1277-89
18. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD,Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature 1986;319:516–18
19. Aklatvala J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. Nature 1986;322:547-9
20. Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Efect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. Arthritis Rheum 1995;38:164–72
21. Cavender D, Saegusa Y, ZiV M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. J Immunol 1987;139:1855–60
22. Rathanaswami P, Hachicha M, Wong WL, Schall TJ, McColl SR. Synergistic eVect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation. Arthritis Rheum 1993; 36:1295–304
23. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. Ann Rheum Dis 1999;58:(Suppl I) I32–I39
24. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumor necrosis factor α and transforming growth factor β during induction of collagen type II arthritis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:7375–9
25. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:9784–8
26. Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. Immunology 1992;77:510–14
27. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1994;106:1455–66
28. Breese E, MacDonald TT. TNF alpha secreting cells in normal and diseased human intestine. Adv Exp Med Biol 1995;371B:821–4
29. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989;7:145-73
30. Powrie F, Lesch MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4_ T cells. Immunity 1994;1:553-62
31. van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. Gut 1997;40:443–8
32. Kaiser GC, Polk DB. Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. Gastroenterology 1997;112:1231–40
33. Piguet PF, Vesin C, Guo J, Donati Y, Barazzone C. TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by the TNF receptor 1 and does not require p53. Eur J Immunol 1998;28:3499–505
34. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. N Engl J Med 1991;325:467–72
35. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. J Exp Med 1989;170:607–12
36. Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. J Immunol 1987;139:2593–7
37. Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. Ann Neurol 1988;23:339–46
38. Gratacos J, Collado A, Filella X, et al. FERUM cytokines (IL-6, TNF-a, IL-1b and IFN-g) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. Br J Rheumatol 1994;33:927–31
39. Sonel B, Tutkak H, Duzgun N. Serum levels of IL-1beta, TNF-alpha, IL-8, and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies. Joint Bone Spine 2002;69:463–7
40. Canete JD, Llena J, Collado A, et al. Comparative cytokine gene expression in synovial tissue of early rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. Br J Rheumatol 1997;36:38–42
41. Gu J, Rihl M, Marker-Hermann E, et al. Clues to pathogenesis of spondyloarthropathy derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles. J Rheumatol 2002;29:2159–64
42. Moler KM, Torrance DS, Smith CA, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in letal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. J Immunol 1993;151:1548-61
43. Olsen N, Stein M. New Drugs for rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2004;350:2167-79
44. Keystone EC, Schiff MH, Kremer JM, et al. Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized,double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2004;50:353-63
45. Barone D, Krantz C, Lambert D, et al. Comparative análisis of the ability of etanercept and infliximab to lyse TNF-expressing cells in a complement dependent fashion. Arthritis Rheum 1999;42:S369
46. Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, et al. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. J Immunol 1993;151:6602–7
47. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, et al Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized controlled trial. Ann Intern Med 1999;130:478-86
48. Moreland LW, Baumgartner SW, SchiV MH, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. N Engl J Med 1997;337:141–7
49. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. N Engl J Med 1999;340:253-9
50. Moreland LW, Cohen SB, Baumgartner S, Schiff M, Tindall EA, Burge DJ. Long-term use of etanercept in patients with DMARD-refractory rheumatoid artritis (resumen). Arthritis Rheum 1999;42:Suppl:S401

51. Bathon JM, Genovese MC, Martin RW, et al : Etanercept (Enbrel®) in Early Erosive Rheumatoid Arthritis (ERA trial) : observation at 3 years (resumen). Ann Rheum Dis 2002; 61[Suppl]:S54
52. Genovese MC, Bathon JM, Martin R, et al: Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two year radiographic and clinical outcomes. Arthritis Rheum 2002;46:1443-50
53. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, et al. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2000;342:763-9
54. Knight DM, Trinh H, Le J, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol 1993;30: 1443-53
55. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghrayeb J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. Cytokine 1995;7:251-9
56. Elliot MJ, Maini RN. Feldman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α. Arthritis Rheum 1993;36:1681-90
57. Williams RO, Feldman M, Maini RN. Anti tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:9784-88
58. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2002;46:1451-59
59. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor a (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. Lancet 1994;344:1105-10
60. Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor *a* monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1996;39:1077-81
61. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor *a* monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1998;41:1552-63
62. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, et al. Infliximab (chimeric antitumor necrosis factor *a* monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. Lancet 1999;354:1932-9
63. Lipsky PE, van der Heijde DMFM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2000;343:1594-602
64. Kavanaugh A, St Clair EW, McCune WJ, et al. Chimeric anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. J Rheumatol 2000;27: 841-50
65. Salfeld J, Kaymaçalan Z, Tracey D, Roberts A, Kamen R. Generation of fully human anti-TNF antibody D2E7 (resumen)). Arthritis Rheum 1998;41 (suppl):S57
66. Emery P, van de Putte LBA, van Riel PLCM, et al. Changes in pro-MMP-1 in relation to Standard measures of disease activity over a 6-month treatment period with adalimumab (DE7) in rheumatoid arthritis (resumen). Arthritis Rheum 2001;44(suppl):S215
67. Humira (adalimumab). Abbott Laboratorios (package insert). http://www.fda.gov/cder/foi/label/ 2002/adalabb123102LB.htm
68. van de Putte LBA, Atkins C, Malaise M,et al. Adalimumab (D2E7) monotherapy in the treatment of patients with severely active rheumatoid artritis (resumen). Arthritis Rheum 2002;46:Suppl:S205
69. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, et al: Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonat antibody, for the treatment for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate ARMADA trial. Arthritis Rheum 2003;48:35-45
70. Keystone E, Kavanaugh A, Sharp J, et al: Adalimumab (D2E7), a fully human anti-TNFα monoclonal antibody, inhibits the progression of structural damage in patients with active rheumatoid arthritis despite concomitant methotrexate therapy (resumen). Arthritis Rheum 2002;46 (Suppl 9):S205
71. Van de Putte LBA, Rau R, Breedveld FC, et al: Six month efficacy of the fully human anti-TNF antibody D2E7 in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2000;59(Suppl 1):I47
72. Van Den BF, Kruithof E, Baeten D, et al. Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondylarthropathy. Arthritis Rheum 2002;46:755–65
73. US Food and Drug Administration. Clinical review. Adalimumab -for use in the treatment of rheumatoid arthritis. www.fda.gov/cder/biologics/review/adalabb123102r1.htm
74. Bang LM, Keating GM. Adalimumab: a review of its use in rheumatoid arthritis. BioDrugs 2004;18:121–39
75. Mease PJ, GoVe BS, Metz J, Vanderstoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. Lancet 2000;356:385–90
76. Mease PJ. Cytoquine blockers in psoriatic artritis. Ann Rheum Dis 2001;60:iii37-iii40
77. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, et al. Enbrel (etanercept) in patients with psoriatic arthritis and psoriasis [Abstract]. Arthritis Rheum 2000;43(suppl):S403
78. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, et al. Enbrel (etanercept) in patients with psoriatic arthritis and psoriasis (resumen). Ann Rheum Dis 2001; 60:146
79. Mease P, Kivitz A, Burch F, et al. Improvement in disease activity in patients with psoriatic arthritis receiving etanercept (Enbrel): results of a phase 3 multicenter clinical trial (resumen). Arthritis Rheum 2001;44(suppl):S90
80. Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, et al. Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. Arthritis Rheum. 2003;48:3230-6
81. Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. N Engl J Med. 2002;346: 1349-56
82. Brandt J, Khariouzov A, Listing J, et al. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 2003;48:1667-75
83. Marzo-Ortega H, McGonagle D, O'Connor P, Emery P. Efficacy of etanercept in the treatment of the entheseal pathology in resistant spondylarthropathy: a clinical and magnetic resonance imaging study. Arthritis Rheum. 2001 ;44:2112-7
84. Davis J Jr, Webb A, Lund S, Sack K. Results from an open-label extension study of etanercept in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. 2004 15;51:302-4
85. Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. Clin Infect Dis 2004;38:1261–5
86. Keane J , Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 2001;345:1098–104
87. Schiff M , van der Putter LB, Breedveld FC, et al. Rates of infection in adalimumab rheumatoid arthritis clinical trials (resumen). Ann Rheum Dis 2003;62 (suppl 1): 184
88. Furst DE, Wallis R, Beenhouwer D, et al. Tumour necrosis factor antagonists and granulomatous infections: mechanisms of action. Semin Arthritis Rheum (in press)
89. Baecklund E , Ekbom A, Sparen P, Feltelius N, Klareskog L. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. BMJ 1998;317:180–1
90. Bingham SJ, Barcelos A, Buch M, et al. Induction of serological lupus in patients on leflunomide and infliximab (resumen). Arthritis Rheum 2002;46 (suppl) :S168
91. Christopher L , Wigley F. TNF-alpha antagonists induce lupus-like syndrome in patients scleroderma and polyarthritis (reseumen). Arthritis Rheum 2002;46 (suppl):S358
92. De Rycke L , Kruithof E, Van Damme N, et al. Antinuclear antibodies following infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. Arthritis Rheum 2003;48:1015–23
93. Kwon HJ, Cote TR, Cuffe MS, Kramer JM, Braun MM. Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. Ann Intern Med 2003;138:807–11
94. Khanna D , McMahon M, Furst DE. Safety of tumour necrosis factor-alpha antagonists. Drug Saf 2004;27:307–24
95. Cush J , Spiera R. Etanercept update on "dear doctor" safety letter. ACR Hotline 12 May 2002

34

RITUXIMAB EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Gabriel Jaime Tobón
Claudio Galarza
Juan-Manuel Anaya



Contenido

Linfocitos B en autoinmunidad
Características del receptor CD20
Características generales del Rituximab
Usos del Rituximab en enfermedades autoinmunes

Recientemente el interés en el estudio de los linfocitos B en enfermedades autoinmunes se ha incrementado. De esta manera, el Rituximab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor CD20 presente en dichas células, se está convirtiendo en un estrategia terapéutica útil para el manejo de enfermedades autoinmunes y neoplásicas donde estas juegan un papel importante en su fisiopatología. En el presente capítulo se revisan las indicaciones y evidencias actuales del manejo con Rituximab en diferentes enfermedades autoinmunes.

El sistema inmune normalmente no desencadena respuesta contra autoantígenos, y de esta manera, la respuesta autoinmune "normal", aunque es fisiológica, no produce manifestaciones patológicas. La tolerancia inmunológica fue postulada hace cerca de 50 años, pero sus bases multifactoriales son todavía controversiales (1). La tolerancia se genera en dos niveles. El "nivel superior" de tolerancia central se desarrolla principalmente en la vida fetal, mientras que el "nivel inferior" de tolerancia periférica se desarrolla de forma postnatal. La enfermedad autoinmune corresponde a un síndrome clínico causado por pérdida de la tolerancia, y se caracteriza por activación de células T ó B, o ambas, que lleva a daño tisular (patología) en ausencia de una infección activa u otra causa discernible (2).

En años recientes, los avances en el entendimiento de la regulación del sistema inmune han llevado a la identificación de diferentes blancos moleculares y celulares que podrían afectar la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes (3). Diversos grupos celulares participan en el proceso autoinmune, incluyendo linfocitos T, macrófagos y linfocitos B, entre otros. Aunque los linfocitos T se han considerado como los actores principales en el proceso de autoinmunidad, recientemente ha surgido un interés importante en los linfocitos B y su papel en estas patologías. Estas células participan principalmente en la producción de autoanticuerpos, presentación antigénica (3), producción de citoquinas proinflamatorias (4) y regulación de la función de las células dendríticas (5). De esta manera, este grupo celular se ha convertido en un importante blanco terapéutico para el manejo de las enfermedades autoinmunes.

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal IgG1, dirigido contra el receptor CD-20 presente en los linfocitos B. El anticuerpo corresponde a una inmunoglobulina IgG1 kappa, compuesta de una porción murina (cadenas ligera y pesada de la región variable) y una región constante humana (6). El dominio Fab (murino) del Rituximab se une al antígeno CD20 de los linfocitos B, y el dominio Fc (humano) realiza las funciones efectoras del sistema inmune, con el fin de inducir la lisis de los linfocitos B (Figura 1) (6). Los mecanismos que explican la lisis de los linfocitos B son, entre otros, la activación del complemento (citotoxicidad celular dependiente de complemento) (CDCC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (6), e inducción de apoptosis cuando interactúa con células portadoras del receptor Fc γ para las inmunoglobulinas (7). Otro efecto importante del Rituximab es la disminución en el número de linfocitos B presentadores de antígenos, lo que a su vez puede disminuir la activación de los linfocitos T involucrados en procesos autoinmunes.

El Rituximab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la "Food and Drug Administration" (FDA) para el manejo de enfermedades malignas (linfomas de células B no Hodgkin, tanto en linfoma refractario, como en recaídas y en linfoma folicular de bajo grado con células CD 20^{+}), y desde su introducción se ha utilizado en más de 300,000 pacientes con este tipo de patologías (8).

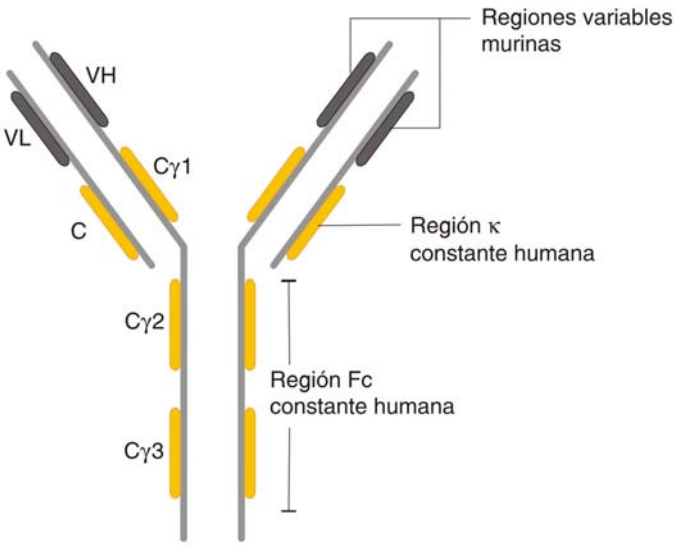


FIGURA 1.
Estructura del Rituximab.
Anticuerpo monoclonal quimérico, en donde su fracción Fab es murina y la fracción Fc es humana.

El antígeno CD 20 (antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos B humanos, o Bp35), es una proteína transmembrana con un peso molecular aproximado de 35 kD, localizado en los linfocitos pre-B y B maduros (Figura 2) (9,10), además del 90% de los linfomas no-Hodgkin de células B (11). El receptor CD 20 no se encuentra en las células madre hematopoyéticas, ni en las células pro-B, células plasmáticas normales o en otros tejidos normales (12). El CD 20 regula algunos pasos tempranos en el proceso de activación para el ciclo celular y diferenciación (12), y posiblemente funcione como un canal de calcio (13). El antígeno CD 20 no es liberado de la superficie celular y no se internaliza en las células luego de la unión del anticuerpo (14). El antígeno CD 20 libre no es encontrado en la circulación (10). Su gen es codificado en el cromosoma 11, posee 7 exones, y es bastante polimórfico, teniendo al menos 34 polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) registrados (15).

El Rituximab se está utilizando actualmente en el manejo de diferentes enfermedades autoinmunes. Aunque la artritis reumatoidea (AR) es la única enfermedad autoinmune en la cuál su eficacia ha sido demostrada por medio de un estudio clínico controlado (16), el Rituximab también está siendo usado para tratar diferentes enfermedades autoinmunes y neoplásicas donde las células B están implicadas en fisiopatología, entre las cuales se encuentran la leucemia linfocítica crónica (17), el linfoma de células peludas (18), la púrpura trombocitopénica idiopática (19), polineuropatía mediada por IgM (20), miastenia gravis (21), enfermedad por aglutininas frías (22), dermatomiositis refractaria (23), granulomatosis de Wegener (24), lupus eritematoso sistémico (LES) (25), y síndrome de Sjögren primario (SSp) (26). En particular este medicamento ha sido considerado para el manejo de LES (25,27), AR (28) y SSp (26).

El primer estudio prospectivo de depleción de linfocitos B en el manejo de la AR, incluyó 5 pacientes, quienes alcanzaron mejoría, que perduró entre 6 y 33 meses posterior al tratamiento (29). Este protocolo inicial incluyó manejo combinado con Rituximab y ciclofosfamida. Posteriormente, 17 pacientes fueron tratados con protocolos con menor dosis y reportados en el año 2002 (30), mostrando que las respuestas se correlacionaron con la intensidad del protocolo de acuerdo con la dosis.

Sin embargo, la mayor experiencia con Rituximab en AR se deriva de un ensayo clínico controlado (16), en el cuál 161 pacientes con enfermedad activa pese al uso de otros tratamientos, fueron aleatorizados a recibir 4 esquemas terapéuticos: Metotrexate (MTX) oral (grupo control), Rituximab sólo, Rituximab más ciclofosfamida y Rituximab más MTX. A las 24 semanas, 43% de los pacientes en el grupo de Rituximab más MTX y 41% en el grupo de Rituximab más ciclofosfamida, comparado con MTX sólo (13%), alcanzaron mejoría en el 50% de su compromiso (ACR50). Estas diferencias fueron significativas, y persistieron hasta 48 semanas de seguimiento. Los pacientes toleraron bien el tratamiento, con pocos efectos adversos. En un sólo paciente se registró una infección severa.

En LES, el primer estudio publicado (31), fue un estudio abierto, realizado en 6 pacientes con un cuadro severo a pesar de estar recibiendo altas dosis de esteroides y ciclofosfamida, e incluyó 3 pacientes con nefritis y 1 paciente con compromiso neurológico. Luego del tratamiento con Rituximab, los niveles de linfocitos B disminuyeron en sangre periférica entre los 3 a 16 meses siguientes. Durante el seguimiento (6-18 meses) se reportó mejoría importante en 5 de los 6 pacientes. El mismo grupo reportó los resultados de 6 pacientes con nefritis, de los cuales cuatro experimentaron una mejoría importante de la actividad lúpica y de las características serológicas y de pruebas de función renal (32). Posteriormente se reportaron 18 pacientes con LES, en los cuales la actividad de la enfermedad disminuyó marcadamente en 10 de ellos sin cambios importantes en los niveles de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (33). Existen también reportes de casos en niños con LES, siendo una terapia segura y efectiva en la mayoría de ellos. Otros reportes han indicado el uso de Rituximab en pacientes con LES y anemia hemolítica autoinmune (34), trombocitopenia autoinmune (35) y compromiso neurológico secundario a síndrome antifosfolipídico (36).

En otras patologías como el SSp, se ha reportado mejoría cuando se utiliza el Rituximab como terapia para linfomas asociados a éste. La primera observación al respecto reportó mejoría subjetiva de los síntomas secos (tanto oculares como orales), en un paciente con un linfoma de zona marginal de la glándula parótida (26). Recientemente, la evolución clínica de 4 pacientes manejados con Rituximab para el SSp fue reportada (37). De estos pacientes, tres tenían asociado un cuadro de crioglobulinemia mixta tipo II, el cuál desapareció completamente. Sin embargo no se reportó la evolución de los síntomas secos.

Se ha registrado en algunos estudios que los pacientes que experimentan recaídas en el curso de tratamientos con Rituximab, la manifestación clínica de la enfermedad está precedida a menudo por la reaparición de las células B y/o autoanticuerpos (38).

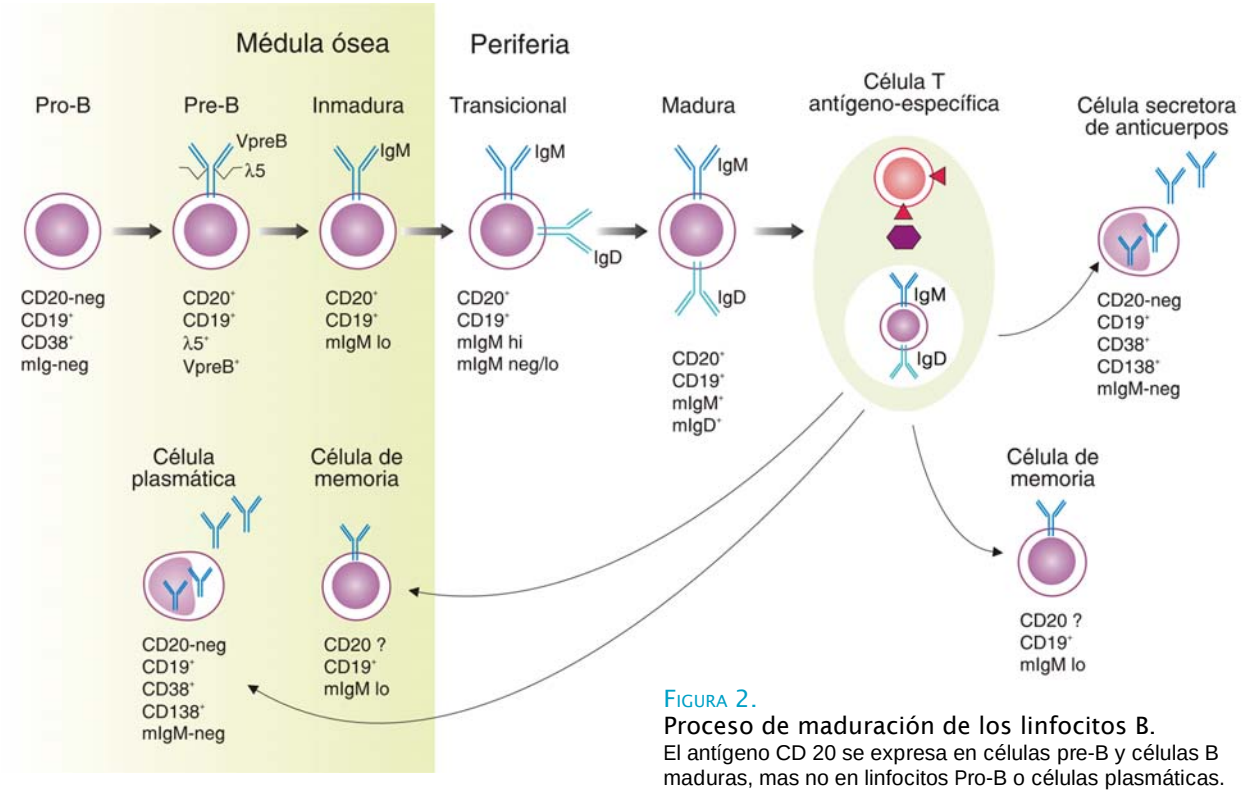


FIGURA 2.
Proceso de maduración de los linfocitos B.
El antígeno CD 20 se expresa en células pre-B y células B maduras, mas no en linfocitos Pro-B o células plasmáticas.

Como se mencionó anteriormente, el gen CD20 es polimórfico. De esta forma, se considera importante que los polimorfismos de este puedan influir en la respuesta terapéutica al Rituximab. Además, el Rituximab interactúa con otras moléculas como los receptores Fc para inmunoglobulinas (IgG) -FcγIIIa (FCGR3A), los cuales también pueden alterar la respuesta clínica a la terapia (39,40). La genotipificación del gen FCGR3A se podría considerar como una herramienta importante para evaluar la posibilidad de eficacia de la terapia con Rituximab en enfermedades autoinmunes (39,41). Estudios posteriores en farmacogenómica de enfermedades autoinmunes son necesarios, debido a que algunos pacientes no tienen respuesta a la terapia con Rituximab, y estos resultados podrían servir como parámetro para determinar qué paciente va o no a tener un curso adecuado con el tratamiento.

Los pacientes con AR con factor reumatoideo (FR) negativo podrían también tener fallas terapéuticas con el Rituximab. En un estudio, 4 de estos pacientes no experimentaron mejoría (42).

Hasta la fecha (octubre de 2004) se han reportado en la literatura al menos 235, 148 y 12 pacientes con AR, LES y SSp, respectivamente tratados con este medicamento. En la Tablas 1 a 4 se presentan los trabajos en diferentes enfermedades autoinmunes que han utilizado Rituximab.

El Rituximab es administrado en una infusión intravenosa a una dosis recomendada de 375 mg/m^2 cada semana por 4 semanas. Este es el protocolo de manejo inicialmente utilizado en linfomas y extrapolado para el manejo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estudios con diferentes esquemas en las últimas patologías son necesarios, para establecer la dosis adecuada. Otro protocolo utilizado es la infusión de 1000 mg/ cada 2 semanas por dos dosis.

La infusión se realiza por vía intravenosa, diluído en solución salina al 0.9%, obteniendo una concentración del medicamento de 1 a 2 mg/mL. Concomitante con la infusión es recomendado la administración de esteroides (ej. metilprednisolona 40 ó 100 mg/por dosis) más un antihistamínico, con el fin de disminuir potenciales efectos adversos derivados de la infusión.

El medicamento es generalmente bien tolerado, y la presentación de efectos adversos serios (ej. anafilaxia) es poco frecuente. Sin embargo, durante la primera infusión, muchos pacientes pueden presentar efectos relacionados con la infusión, los cuales son transitorios, y mejoran con la disminución en la velocidad de perfusión del medicamento, como hipotensión, febrícula, cefalea, entre otros. Estas reacciones tienden a no recurrir con las infusiones siguientes. Sin embargo, el paciente debe recibir un monitoreo estricto de los signos vitales durante la aplicación del medicamento. En caso de presentarse una reacción adversa, la infusión debe detenerse, e iniciar manejo con medidas de soporte (líquidos endovenosos, vasopresores, oxígeno, acetaminofén, etc). En la mayoría de los casos la infusión puede re-iniciarse a la mitad de la velocidad anterior (ej. de 100 mL/hora a 50 mL/hora), cuando los síntomas se resuelvan por completo.

Otros efectos adversos reportados son arritmias, falla renal (en pacientes con linfomas, con síndrome de lisis tumoral) y reacciones mucocutáneas (de aparición entre 1 y 3 semanas posterior a la infusión).

La formación de anticuerpos humanos antiquiméricos debe ser considerada, porque la sensibilización puede llevar a reacciones alérgicas más severas, y relacionado con el tratamiento, la efectividad del fármaco disminuye. Sin embargo, la aparición de estos anticuerpos parece ser baja con Rituximab. En un estudio, de 356 pacientes tratados, solamente 4 presentaron positividad para estos anticuerpos, de los cuales 3 tenían una respuesta clínica favorable. Es prudente, de todas formas, esperar el curso de otros estudios con mayor tiempo de seguimiento sobre este tópico.

El medicamento está contraindicado en pacientes con antecedentes de alergia al Rituximab, o a proteínas murinas. En el embarazo no se conoce su perfil de seguridad. No se sabe si el Rituximab puede causar lesiones fetales tras su administración a mujeres embarazadas o si puede afectar su fecundidad. Dado que las inmunoglobulinas IgG atraviesan la barrera placentaria, el Rituximab puede causar depleción de los linfocitos B en el feto. Por ello, el tratamiento debe usarse únicamente cuando los beneficios esperados sean mayores que el riesgo potencial.

En un reciente estudio realizado por nuestro grupo, se evaluó la efectividad y tolerancia del Rituximab en el manejo de diversas enfermedades autoinmunes en pacientes refractarios a los manejos previos. Se evaluaron 20 pacientes en total (11 con AR, 8 con LES y una paciente con SSp). De los 20 pacientes, 18 tuvieron una importante mejoría en su enfermedad, demostrados por parámetros de actividad en patologías como LES y la AR, y mejoría de los síntomas secos en los pacientes con SSp. Además 2 pacientes con parotidomegalia tuvieron significativa mejoría de ésta posterior al tratamiento. Dos pacientes presentaron efectos adversos, los cuales fueron transitorios (hipotensión y brote cutáneo). A pesar de suspender la infusión del medicamento, y de recibir una dosis menor, estos pacientes tuvieron una marcada mejoría. Otro hallazgo que nos ha llamado la atención es la drástica disminución de la proteinuria en 3 pacientes con nefropatía lúpica tratados con Rituximab.

En el futuro se esperan resultados de estudios clínicos controlados en otras enfermedades como LES y SSp, que ofrezcan mayor evidencia de la efectividad y tolerancia de este medicamento.

En conclusión, la terapia con Rituximab, con el objetivo de disminuir las células B, se está convirtiendo en un tratamiento efectivo para diversas enfermedades autoinmunes, sumado al ya conocido éxito en el manejo de linfomas de células B. Es un medicamento seguro, bien tolerado, y con poca aparición de efectos adversos.

Tabla 1. Rituximab en artritis reumatoide.

Autor/ Referencia	País	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Roll et al (43)	Alemania	7	40	El tratamiento con Rituximab causó un cambio significativo en el patrón de células B en sangre periférica. La re-población por células B fue principalmente realizadas por células B vírgenes y ocurrió entre 6 y 9 meses luego de la depleción.
Emery et al (44)	Reino Unido	161	24	161 pacientes con respuesta inadecuada al MTX fueron randomizados a recibir Rituximab solo, MTX solo, Rituximab más ciclofosfamida y Rituximab más MTX. El tratamiento con Rituximab más MTX produjo una respuesta sustancial en pacientes con AR activa por más de dos años.
Ng et al (45)	Estados Unidos	161	NA	La administración concomitante de ciclofosfamida y MTX no afectó la farmacocinética del Rituximab. El área de superficie corporal y el género fueron los factores que más influyeron en el volumen de distribución y en la depuración del Rituximab.
Edwards et al (16)	Estados Unidos	161	48	Estudio randomizado controlado que mostró efectividad del Rituximab asociado con MTX o ciclofosfamida comparado con MTX solo.
Kneitz et al (46)	Alemania	5	11	4/5 pacientes tuvieron una mejoría significativa (> 1.2) en el puntaje de actividad (DAS28).
Cambridge et al (38)	Reino Unido	23	33	Una respuesta clínica ocurrió en correlación con una caída significativa en los niveles de proteína C reactiva y en autoanticuerpos.
Leandro et al (47)	Reino Unido	22	6	La depleción de los linfocitos B en AR mostró ser segura y asociada con mayor mejoría en los protocolos con Rituximab 600 mg/m2 o ciclofosfamida, pero no con protocolos más limitados.
De Vita et al (42)	Italia	5	12	Dos pacientes experimentaron una importante mejoría, 2 pacientes una mejoría parcial y 1 paciente no presentó mejoría.
Stewart et al (48)	Estados Unidos	1	NA	Se alcanzó una remisión completa con la combinación del tratamiento en un paciente con AR y linfoma.
Estudio propio	Colombia/ Ecuador	11	6.5	Los 11 pacientes presentaron mejoría en mHAQ, DAS 28 y/o en características clínicas (dolor, conteo articular)

MTX: metotrexate; DAS: disease activity score; AR: artritis reumatoide; mHAQ: modified health assessment quality; NA: no disponible.

TABLA 2. Rituximab en LES.

Autor	País	Manifestación	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Anolik et al (49)	Estados Unidos	LES	18	36	La depleción de células B con Rituximab mejoró dramáticamente las anormalidades en la homeostasis de células B y tolerancia características del LES. La persistencia de títulos altos de autoanticuerpos puede deberse a la persistencia de células B de memoria o plasmáticas.
Albert et al (50)	Estados Unidos	LES	11	12	Ocho pacientes completaron las infusiones. Seis pacientes mostraron respuesta clínica. Dos de ellos presentaron una larga remisión, mientras que los cuatro restantes esta remisión fue corta.
Ryan et al (51)	Estados Unidos	LES	4	3	Mejoría en el SLEDAI.
Wallerskog et al (52)	Suecia	LES	NA	12	Todos los pacientes respondieron clínicamente, tanto de forma rápida como lenta (más de 4 meses). Los pacientes que respondieron rápido y lento pueden ser diferenciados inmunológicamente antes del tratamiento, con un radio de células T CD4+/CD8+ diferente, y células B vírgenes/memoria.
Tanaka et al (53)	Japon	LES	5	20	Los 5 pacientes presentaron una reducción en los puntajes de SLEDAI. No se observaron efectos adversos significativos. Se observó expresión a la baja de CD40 y CD80, indicando que la activación de las células T por estas moléculas coestimulatorias puede ser alterada con el tratamiento.
Leandro et al (54)	Reino Unido	LES	21	19	Todos los pacientes presentaron una respuesta mayor al Rituximab. Un paciente presentó una reacción severa asociada con la infusión. No se observaron otros eventos adversos. La falla para depletar las células en el primer tratamiento y repoblación temprana con células B indica que el protocolo necesita ser revisado.
Cambridge et al (55)	Reino Unido	LES	8	12	La mayoría de los anti-ENAs y anticuerpos antimicrobianos se mantuvieron estables a pesar de la terapia de ablación de linfocitos B. Todos los pacientes tuvieron depleción de linfocitos B periféricos y mejoraron clínicamente.
Cambridge et al (56)	Reino Unido	LES	7	12	El incremento en los niveles de algunos anticuerpos anti-ENAs pueden reflejar su sensibilidad a la expansion inducida por BlyS. Todos los pacientes alcanzaron depleción de células B y mejoría clínica.
Sfikakis et al (57)	Grecia	LES y nefritis activa	10	8	Posterior a la depleción de las células B, la remisión de la nefritis lúpica está asociada con disminución en la activación de células T ayudadoras, sugiriendo un papel adicional, independiente de la producción de anticuerpos en la génesis de la enfermedad.
Neuwelt et al (58)	Reino Unido	Neurolupus	7	6	El tratamiento con Rituximab puede ofrecer una remisión prolongada del compromiso del SNC severo posterior al uso de ciclofosfamida y plamaféresis.
Thatayatikom et al (59)	Estados Unidos	LES pediátrico	3	12	Los 3 pacientes mejoraron clínicamente. No se observaron efectos adversos. Dos pacientes necesitaron re-tratamiento a los 5 y 6 meses respectivamente.
Armstrong et al (60)	Reino Unido	LES activo (trombocitopenia, nefritis, y compromiso neurológico)	4	12	Incluso un regimen de bajas dosis de Rituximab y corticoesteroides puede inducir remisión en pacientes con enfermedad activa resistente a tratamiento agresivo incluyendo entre ellos ciclofosfamida.
Diaz et al (61)	España	LES / Trombocitopenia autoinmune	4	10	Dos pacientes con trombocitopenia autoinmune y lupus y un paciente (de dos) con lupus-like, presentaron mejoría en el recuento de plaquetas. Aunque la efectividad es de poca duración, los pacientes pueden responder después.
Ferraccioli et al (62)	Italia	Trombocitopenia autoinmune, nefritis, compromiso SNC, leucopenia	2	4	Seguimiento corto. Los dos pacientes presentaron mejoría en el recuento de plaquetas, leucocitos y hemoglobina.

Autor	País	Manifestación	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Gunnarsson et al (63)	Suecia	LES severo	11	12	El tratamiento fue bien tolerado y no se presentaron efectos adversos serios. A los 6 meses de seguimiento, todos los pacientes presentaron respuesta clínica y/o histopatológica. El tratamiento combinado con ciclofosfamida y Rituximab puede ser efectivo.
Guzman et al (64)	Colombia	LES refractario	2	6	Los dos pacientes mejoraron de la nefritis, del compromiso cutáneo y SNC.
Ten Cate et al (35)	Reino Unido	Trombocitopenia autoinmune en LES	1	NA	Mejoría en las manifestaciones clínicas.
Saito et al (65)	Japon	LES compromiso renal y neurológico	1	NA	Tratamiento exitoso con Rituximab en LES con compromiso renal y neurológico severo.
Fra et al (66)	Italia	LES y síndrome nefrótico	1	24	El tratamiento combinado de Rituximab más ciclofosfamida alcanzó importante mejoría.
Weide et al (67)	Alemania	LES-SNC	2	30	El tratamiento con Rituximab en terapia de mantenimiento puede ser una terapia efectiva en lupus.
Saigal et al (68)	Estados Unidos	Vasculitis urticarial hipocomplemen-témica	1	NA	Un paciente con vasculitis urticariforme más angioedema, presentó una rápida respuesta al Rituximab.
Kneitz et al (69)	Alemania	LES y trombocito-penia autoinmune	4	12	Un paciente con LES con trombocitopenia severa refractaria presentó una respuesta favorable al tratamiento, mientras otro paciente tuvo falla terapéutica.
Anolik et al (41)	Estados Unidos	LES	12	2	El genotipo del FcgammaRIIIa fue un predictor independiente de la respuesta y eficacia de la depleción de las células B por el Rituximab.
Leandro et al (31)	Reino Unido	LES	6	6	Cinco pacientes presentaron mejoría. En particular la fatiga, el compromiso articular y la serositis respondieron bien a este protocolo.
Perrota et al (34)	Italia	LES y anemia hemolítica	1	7	La anemia mejoró rápidamente luego de la terapia.
Petschner et al (70)	Alemania	LES e histiocitosis de Rosai-Dorfman	1	18	Todos los signos y síntomas mejoraron rápidamente.
Estudio propio	Colombia/ Ecuador	LES activo	8	6.5	Seis de los 8 pacientes tuvieron mejoría en el SLEDAI.

LES: lupus eritematoso sistémico; SLEDAI: Indice de actividad del lupus eritematoso sistémico; NA: no disponible; ENA: antígenos nucleares extractables.

TABLA 3. Rituximab en síndrome de Sjögren.

Autor	País	Manifestación	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Pijpe et al (71)	Holanda	SS	6	NA	Dos de los 6 pacientes desarrollaron una enfermedad del suero después de la segunda infusión. Los datos sobre la eficacia clínica sugieren una marcada mejoría en las quejas subjetivas (fatiga, síntomas secos y estado de salud), y un aumento en la función de las glándulas salivares.
Voulgarelis et al (72)	Grecia	SS-más linfoma no-Hodgkin de células B agresivo	4	23	El Rituximab más la terapia CHOP fue bien tolerado y efectivo en todos los 4 pacientes. Los signos y síntomas de la crioglobulinemia mixta concomitante mejoraron de forma significativa luego del tratamiento.
Somer et al (26)	Estados Unidos	SS y linfoma de zona marginal	1	NA	Mejoría en el SS luego de la terapia con Rituximab para el linfoma de zona marginal.
Shin et al (73)	Estados Unidos	SS y linfoma	1	NA	La tomografía por emission de positrons LF-18 FDG mostró resolución del linfoma no-Hodgkin de la glándula parótida en un paciente con SS.
Estudio propio	Colombia/ Ecuador	SS	1	7	Mejoría en la parotidomegalia bilateral. La paciente presentó hipotensión durante la segunda perfusión.

SS: Síndrome de Sjögren; CHOP: regimen quimioterápico que incluye ciclofosfamida y esteroides entre otros; NA: no disponible.

TABLA 4. Rituximab en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes reumatológicas.

Autor	País	Manifestación	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Quartuccio et al (74)	Italia	Crioglobulinemia mixta Tipo II	4	27	Todos los pacientes presentaron mejoría en la proteinuria e incremento en la rata de filtración glomerular. Ningún paciente sufrió eventos mayores con el medicamento.
Russo et al (75)	Argentina	Trombocitopenia autoinmune	2	28	Dos pacientes con la patología presentaron mejoría en el conteo de plaquetas y no nuevos episodios de hemorragia.
Keogh et al (76)	Estados Unidos	Vasculitis asociada con ANCAs	10	12	Todos los pacientes toleraron bien las infusions del Rituximab. Todos presentaron mejoría clínica y ninguno presentó recaídas.
Akilidiz et al (77)	Turquía	Anemia hemolítica	1	NA	El paciente mejoró luego de la anemia hemolítica, asociada con un trasplante hepático.
Trude et al (78)	Alemania	Púrpura trombocito-pénica immune crónica	1	15	Inicialmente, la terapia con Rituximab fue exitosa, pero la paciente recayó luego de 57 semanas del tratamiento.
Raj et al (79)	Estados Unidos	Anemia hemolítica autoinmune refractaria	1	NA	Tratamiento exitoso en un paciente con anemia hemolítica refractaria luego de un trasplante de médula ósea como enfermedad de base anemia de células falciformes.
Berentsen et al (80)	Noruega	Enferemedad por aglutininas frías crónica	27	11	Catorce de los 27 pacientes en el primer curso y 6 de 10 retratados respondieron al tratamiento.
Cooper et al (81)	Estados Unidos	Púrpura trombocito-pénica immune crónica	57	12	El Rituximab fue bien tolerado y sin complicaciones inmediatas. Además indujo una respuesta sustancial duradera en el 32% de los adultos con la patología.
Webster et al (82)	Canadá	Anemia hemolítica	1	9	Una pronta respuesta se observó en un paciente con anemia hemolítica en el contexto de autoanticuerpos fríos y calientes (tercera perfusión).

Autor	País	Manifestación	Pacientes (número)	Seguimiento (meses)	Comentarios
Zaja et al (17)	Italia	Enfermedad auto-inmune asociada a leucemia linfocítica crónica	7	12	Siete pacientes con la patología refractarios al tratamiento con terapias inmunosupresoras estándar fueron tratados con Rituximab. Los signos y síntomas mejoraron en todos ellos.
Galor et al (83)	Estados Unidos	Anemia hemolítica autoinmune	1	9	El medicamento fue bien tolerado y el paciente se mantuvo en remisión 9 meses luego de finalizar la terapia.
Nuramg et al (84)	Estados Unidos	Anemia hemolítica autoinmune	6	48	Cinco de los seis casos respondieron.
Bengtson et al (85)	Estados Unidos	Trombocitopenia autoinmune	1	NA	Mejoría en un niño con púrpura trombocitopénica inmune severa.
Shanafelt et al (86)	Estados Unidos	Citopenias autoinmunes	14	NA	El Rituximab merece ser considerado temprano en el tratamiento de citopenias autoinmunes que son refractarias tanto al tratamiento convencional con esteroides como a la esplenectomía.
Rinsek et al (87)	Holanda	Trombocitopenia autoinmune	1	7	Respuesta duradera y efectiva.
Buda-Okreglak et al (88)	Estados Unidos	Macroglobulinemia de Waldenstrom	1	NA	El paciente presentó una recaída similar a una artritis reumatoide.
Endo et al (89)	Japón	Anemia hemolítica autoinmune	1	NA	Tratamiento exitoso con Rituximab en un paciente con anemia hemolítica concomitante con gamapatía monoclonal y proliferación de virus Epstein-Barr.
Gotardo et al (90)	Australia	Anemia hemolítica autoinmune	1	NA	Primer reporte en el cuál el Rituximab fue empleado efectivamente para inducir una remisión duradera en un niño con una anemia hemolítica recurrente.
Camou et al (91)	Francia	Enfermedad por aglutininas frías	5	NA	El tratamiento permitió una remisión en todos los casos (4 parcial, 1 completa).
Zaja et al (92)	Italia	Trombocitopenia autoinmune	20	6	El Rituximab demostró ser efectivo en 13 de 20 pacientes, siendo completa en 9 y parcial en 4.
Zecca et al (93)	Italia	Anemia hemolítica aguada en niños	15	13	Trece pacientes (87%) respondieron, mientras que dos pacientes no presentaron ninguna mejoría.
Aggarwal et al (94)	Estados Unidos	Púrpura trombocito-pénica immune	3	NA	Los pacientes alcanzaron un conteo de plaquetas acceptable luego del tratamiento.
Giagounidis et al (95)	Alemania	Púrpura trombocito-pénica inmune	12	6	Cinco pacientes alcanzaron una respuesta completa y 2 una respuesta parcial.
Chemnitz et al (96)	Alemania	Púrpura trombocito-pénica trombótica	2	NA	Los dos pacientes respondieron después de la adición del Rituximab mientras continuaban con plasmaféresis.
Arzoo et al (97)	Estados Unidos	Crioglobulinemia mixta esencial tipo II - Síndrome de Goodpasture, cirro-sis biliar primaria	3	NA	El tratamiento con Rituximab resolvió las manifestaciones clínicas y de laboratorio en los tres pacientes.
Specks et al (24)	Estados Unidos	Granulomatosis de Wegener	1	18	A los 8 meses después del segundo ciclo de Rituximab (18 meses después del primero), el paciente se mantuvo en una remisión completa.
Levine (23)	Estados Unidos	Dermatomiositis refractaria	5	12	Todos los pacientes experimentaron una mejoría dramática y sostenida en la fuerza muscular y en la dermatitis.

ANCA: Anticuerpos contra citoplasma de neutrófilos; NA: no aplica.

Referencias

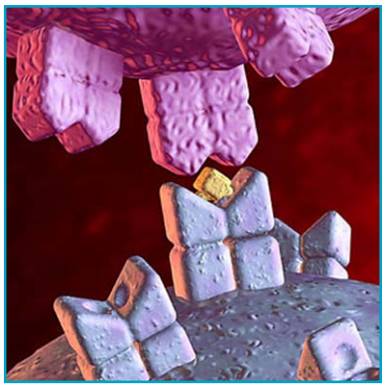
1. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science 1998;280:243-8
2. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. N Eng J Med 2001; 345:340-50
3. Mamula MJ, Fatenejad S, Craft J. B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell response. J Immunol 1994; 152:1453-61
4. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat Immunol 2000; 1: 475-82
5. Moulin V, Andris F, Thielemans K, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. J Exp Med 2000; 192: 475-82
6. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 1994; 83:435-45
7. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. Cancer Immunol Immunother 2000; 48: 673-83
8. Sacchi S, Federico GM, Dastoli C, Fiorani G, Vinci V, Casolari B. Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab. Crit Rev Oncol Hematol 2001; 37: 13-25
9. Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. J Biol Chem 1989; 264:11282-287
10. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA.. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. EMBO J 1988;7:711-17
11. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhoupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation. Blood 1984; 63:1424-33
12. Tedder TF, Boyd AW, Freedman AS, Nadler LM, Schlossman SF. The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. J Immunol 1985;135:973-79
13. Tedder TF, Zhou LJ, Bell PD, et al. The CD20 surface molecule of B lymphocytes functions as a calcium channel. J Cell Biochem 1990 ;14D:195.
14. Press OW, Applebaum F, Ledbetter JA, et al. Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B-cell lymphomas. Blood 1987; 69:584-91
15. www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000156738&db
16. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell targeted therapy with Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2004; 350: 2572-81
17. Zaja F, Vianelli N, Sperotto A, et al. Anti-CD20 therapy for chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune diseases. Leuk Lymphoma 2003; 44: 2951-5
18. Berinstein NL, Mangel J. Integrating monoclonal antibodies into the management of mantle cell lymphoma. Semin Oncol 2004; 31 (1Suppl2): 2-6
19. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Armadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001; 98:952-57
20. Weide R, Heymanns J, Koppler H. The polyneuropathy associated with Waldenstrom's macroglobulinaemia can be treated effectively with chemotherapy and the anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab. Br J Haematol 2000; 109: 838-41
21. Zaja F, Russo D, Fuga G, Perella G, Baccarani M. Rituximab for myasthenia gravis developing after bone marrow transplant. Neurology 2000; 55: 1062-63
22. Cohen Y, Polliack A, Zelig O, Goldfarb A. Monotherapy with rituximab induces rapid remission of recurrent cold agglutinin-mediated hemolytic anemia in a patient with indolent lympho-plasmacytic lymphoma. Leuk Lymphoma 2001; 42: 1405-8
23. Levine TD. A pilot study of rituximab therapy for refractory dermatomyositis. Arthritis Rheum 2002; 46 (9 Suppl.):S488 (Abstract)
24. Specks U, Fervenza FC, McDonald TJ, Hogan MC. Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody rituximab. Arthritis Rheum 2001; 44: 2836-40
25. Eisenberg R. SLE. Rituximab in lupus. Arthritis Res Ther 2003; 5: 157-9
26. Somer BG, Tsai DE, Downs L, Weinstein B, Schuster SJ. Improvement in Sjogren's syndrome following therapy with Rituximab for marginal zone lymphoma. Arthritis Rheum 2003;49:394-8.
27. Anolik J, Sanz I, Looney RJ. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus. Curr Rheumatol Rep 2003; 5: 350-6
28. Kramm H, Hansen K, Gowing E, Bridges A. Successful therapy of rheumatoid arthritis with rituximab. Renewed interest in the role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Clin Rheumatol 2004; 10: 28-32
29. Edwards JCW, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. Rheumatology 2001; 40: 205-11
30. Leandro MJ, Edwards JCW, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with RA treated with B lymphocyte depletion. Ann Rheum Dis 2002; 61: 1-5
31. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2002;46:2673-7
32. Leandro MJ, Edwards JCW, Manson J, Cambride G, Isenberg DA. Treatment of refractory lupus nephritis with B lymphocyte depletion. Arthritis Rheum 2003;48:S378:924
33. Looney RJ AJ, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus. A phase I/II dose-escalation trial of Rituximab. Arthritis Rheum 2004; 50:2580-2589
34. Perrotta S, Locatelli F, La Manna A, Cennamo L, De Stefano P, Nobili B. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) for life-threatening autoimmune haemolytic anaemia in a patient with systemic lupus erythematosus. Br J Haematol 2002;116:465-7
35. Ten Cate R, Smiers FJ, Bredius RG, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) for refractory autoimmune thrombocytopenia in a girl with systemic lupus erythematosus. Rheumatology 2004; 43:244
36. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H. Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with Rituximab maintenance therapy. Lupus 2003;12:779-82
37. Voulgarelis M, Giannouli S, Anagnostou D, Tzioufas AG. Combined therapy with Rituximab plus cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone (CHOP) for Sjogren's syndrome-associated B-cell aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Rheumatology 2004; 43:1050-1053
38. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2003;48:2146-54
39. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. Blood 2002; 99: 754-8
40. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. Cancer Res 2004; 64: 4664-9
41. Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, et al. the relationship of FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2003; 48: 455-9.
42. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid artritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. Arthritis Rheum 2002; 46: 2029-33
43. Roll P, Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony HP. B- cell depletion with rituximab in patients with RA causes a sustained suppression of CD27+ B-cells and is followed by a period of increased levels of naïve B- cells in the peripheral blood. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S567 (Abstract)
44. Emery P, Sheeran T, Lehane PB, Saiedabadi N, Shaw TM. Efficacy and safety of rituximab at 2 years following a single treatment in patients with active rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S659 (Abstract).
45. Ng CM, Combs D, Davies B. Effect of body surface area, gender and coadministration of methotrexate or cyclophosphamide on the pharmacokinetics and total drug exposure of rituximab in rheumatoid arthritis patients in a double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S399 (Abstract)
46. Kneitz C, Wilhelm M, Tony HP. Improvement of refractory rheumatoid arthritis after depletion of B cells. Scand J Rheumatol 2004;33:82-6.
47. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. Ann Rheum Dis. 2002;61:883-8
48. Stewart M, Malkovska V, Krishnan J, Lessin L, Barth W. Lymphoma in a patient with rheumatoid arthritis receiving methotrexate treatment: successful treatment with rituximab. Ann Rheum Dis 2001; 60: 892-3
49. Anolik JH, Barnard J, Cappione AJ III, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50: 3580-90.

50. Albert D, Khan S, Stansberry J, et al. A phase I trial of rituximab (Anti-CD20) for treatment of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S446 (Abstract)
51. Ryan JP, Singer NG, Scalzi LV. Treatment of resisteant SLE with rituximab administered without cyclophosphamide. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S413 (Abstract)
52. Wallerskog T, Gunnarsson I, van Vollenhoven R, Malmström V, Trollmo C. Immunological characterization can predict the outcome of rituximab treatment in patients with SLE. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S414 (Abstract)
53. Tanaka Y, Tokunaga M, Fujii K, et al. A pilot study of Rituximab (Anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus: relevance of quantity and quality reduction of B cells to clinical efficacy. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S414 (Abstract)
54. Leandro M, Edwards JCW, Ehrenstein MR, Cambridge G, Isenberg DA. B Lymphocyte depletion in the treatment of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S447 (Abstract)
55. Cambridge G, Leandro M, Isenberg DA, Teodorescu M, Ehrenstein MR, Edwards JCW. B Cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and anti-microbial antibody profiles. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S227 (Abstract)
56. Cambridge G, Leandro MJ, Stohl W, et al. Serological changes following B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: Relationship with BlyS. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S645 (Abstract)
57. Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, et al. Remission of proliferative lupus nephritis following anti-B cell therapy is proceed by downregulation of the T cell costimulatory molecule CD40-Ligand. Arthritis Rheum 2004; 50(Suppl.): S227 (Abstract)
58. Neuwelt CM, Young RG, Pfister DA. Role of cyclophosphamide with and without plasmapheresis in thee treatment of CNS neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in combination or as monotherapy with Rituximab. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
59. Thatayatikom A, French AR, White AJ. Rituximab therapy in three pediatric patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
60. Armstrong DJ, Wright SA, Finch MB, Taggart AJ, Bell AL. Active systemic lupus erythematosus (SLE) successfully treated with rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) and oral steroid, without intravenous cyclophosphamide-a short series. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
61. Diaz C, Camps MT, Barón MA, et al. Rituximab treatment of autoimmune thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus and lupus-like patients. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
62. Ferraccioli GF, Capuano A, Tomietto P, De Santis M. Rescue of refractory SLE patients with rituximab (RTX). Lupus 2004; (Suppl) (Abstract).
63. Gunnarsson I, Henriksson EW, Sundelin B, Jacobson SH, van Vollenhoven R. Rituximab plus cyclophosphamide in severe SLE: promising results in 11 patients who failed conventional immunosuppressive therapy. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
64. Guzman RA, Roa G. Rituximab in systemic lupus erythematosus. Lupus 2004; (Suppl) (Abstract)
65. Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y. Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. Lupus 2003;12:798-800.
66. Fra GP, Avanzi GC, Bartoli E. Remission of refractory lupus nephritis with a protocol including rituximab. Lupus. 2003;12:783-7.
67. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H. Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy. Lupus 2003;12:779-82.
68. Saigal K, Valencia IC, Cohen J, Kerdel FA. Hypocomplementemic urticarial vasculitis with angioedema, a rare presentation of systemic lupus erythematosus: rapid response to rituximab. J Am Acad Dermatol 2003;49 (5 Suppl):S283-5
69. Kneitz C, Wilhelm M, Tony HP. Effective B cell depletion with rituximab in treatment of autoimmune diseases. Immunobiology 2002;206: 519-27
70. Petschner F, Walker UA, Schmitt-Graff A, Uhl M, Peter HH. Catastrophic systemic lupus erythematosus with Rosai-Dorfman sinus histiocytosis. Successful treatment with anti-CD20/rutuximab. Dtsch Med Wochenschr 2001;126:998-1001
71. Pijpe J, Bootsma H, Van Imhoff G, et al. Rituximab (anti-CD20) for the treatment of primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S575 (Abstract)
72. Voulgarelis M, Giannouli S, Anagnostou D, Tzioufas AG. Rituximab plus CHOP for the treatment of Sjögren's syndrome-associated B-cell aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S575 (Abstract)
73. Shih WJ, Ghesani N, Hongming Z, Alavi A, Schusper S, Mozley D. F-18 FDG positron emission tomography demonstrates resolution of non-Hodgkin's lymphoma of the parotid gland in a patient with Sjogren's syndrome: before and after anti-CD20 antibody rituximab therapy. Clin Nucl Med 2002;27:142-3.
74. Quartuccio L, Soardo G, Romano G, et al. Treatment of glomerulonephiritis in type II mixed cryoglobulinemia with Rituximab. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S235 (Abstract)
75. Russo RA, Braier J, Feliú A, Datsicas MM. Successful use of anti-CD20 (rituximab) in the treatment of severe thrombocytopenia associated with juvenile systemic autoimmune disease. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S531 (Abstract)
76. Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Specks U. Rituximab for remission induction in severe ANCA-associated vasculitis: report of a prospective open-label pilot trial in 10 patients. Arthritis Rheum 2004; 50 (Suppl.): S270 (Abstract)
77. Akvildiz M, Karasu Z, Cagirgan S, Kilic M, Tokat Y. Rituximab therapy for life-threatining immune hemolytic anemia in a liver tranplant recipient: a case report. Transplant Proc 2004 36:1492-3
78. Thude H, Gruhn B, Werner U, et al. Treatment of a patient with chronic immune thrombocytopenic purpura with rituximab and monitoring by flow cytometric analysis. Acta Haematol. 2004;111:221-4
79. Raj A, Bertolone S, Cheerva A. Successful treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia with monthly rituximab following non-myeloablative stem cell transplantation for sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol 2004;26:312-4
80. Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT, et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. Blood 2004;103:2925-8
81. Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, et al. The efficacy and safety of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 2004; 125:232-9
82. Webster D, Ritchie B, Mant MJ. Prompt response to rituximab of severe hemolytic anemia with both cold and warm autoantibodies. Am J Hematol 2004;75:258-9
83. Galor A, O'Brien T. Rituximab treatment for relapsed autoimmune hemolytic anemia in Evans syndrome. Int J Hematol 2003;78:335-6.
84. Nurang M, Penner JA, Williams D. Refractory autoimmune thrombocytopenic purpura: responses to treatment with a recombinant antibody to lymphocyte membrane antigen CD20 (rituximab). Am J Hematol 2003 ;74:263-7.
85. Bengtson KL, Skinner MA, Ware RE. Successful use of anti-CD20 (rituximab) in severe, life-threatening childhood immune thrombocytopenic purpura. J Pediatr 2003;143:670-3
86. Shanafelt TD, Madueme HL, Wolf RC, Tefferi A. Rituximab for immune cytopenia in adults: idiopathic thrombocytopenic purpura, autoimmune hemolytic anemia, and Evans syndrome. Mayo Clin Proc 2003; 78:1340-6
87. Riksen NP, Keuning JJ, Vreugdenhil G. Rituximab in the treatment of relapsing idiopathic thrombocytopenic purpura. Neth J Med 2003; 61:262-5
88. Buda-Okreglak EM, Drabick JJ, Delaney NR. Proinflammatory syndrome mimicking acute rheumatoid arthritis in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia treated with rituximab. Ann Hematol 2004;83:117-9
89. Endo T, Nakao S, Koizumi K, et al. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonal gammopathy in a post-nonmyeloablative stem cell transplant patient. Ann Hematol 2004;83:114-6
90. Gottardo NG, Baker DL, Willis FR. Successful induction and maintenance of long-term remission in a child with chronic relapsing autoimmune hemolytic anemia using rituximab. Pediatr Hematol Oncol 2003;20:557-61
91. Camou F, Viallard JF, Pellegrin JL. Rituximab in cold agglutinin disease. Rev Med Interne 2003;24:501-4
92. Zaja F, Vianelli N, Sperotto A, et al. B-cell compartment as the selective target for the treatment of immune thrombocytopenias. Haematologica 2003; 88:538-46
93. Zecca M, Nobili B, Ramenghi U, et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. Blood 2003; 101:3857-61
94. Aggarwal A, Catlett JP. Rituximab: an anti-CD20 antibody for the treatment of chronic refractory immune thrombocytopenic purpura. South Med J. 2002;95:1209-12
95. Giagounidis AA, Anhuf J, Schneider P, et al. Treatment of relapsed idiopathic thrombocytopenic purpura with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: a pilot study. Eur J Haematol 2002;69:95-100
96. Chemnitz J, Draube A, Scheid C, et al. Successful treatment of severe thrombotic thrombocytopenic purpura with the monoclonal antibody rituximab. Am J Hematol 2002 ;71:105-8
97. Arzoo K, Sadeghi S, Liebman HA. Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). Ann Rheum Dis 2002;61:922-4

35

OTRAS TERAPIAS BIOLÓGICAS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Ricardo Pineda-Tamayo
Carlos Enrique Toro
Carlos A. Cañas D.



Contenido

Vía coestimuladora B7: CD28/CTLA-4
Sistema CD2 – LFA3
Sistema LFA-1 – ICAM-1
Regulación de la actividad de:
- Interleuquina-1
- Interleuquina-6
- Interleuquina-12
- Interleuquina-18
- Otras interleuquinas

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por el desarrollo de una respuesta inmune no regulada dirigida hacia estructuras propias. El conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en este proceso patológico, ha permitido el desarrollo de productos biológicos capaces de modificar el curso de la enfermedad. Algunas de estas terapias biológicas ya han demostrado su eficacia en ensayos clínicos controlados, mientras que otras se encuentran aún en fase experimental y se constituyen en terapias promisorias para el manejo de diversas entidades autoinmunes en un futuro cercano.

Introducción

El linfocito T (LT), una de las células efectoras del sistema inmune adaptativo, es sin duda, un elemento esencial en la fisiopatología de diversas enfermedades autoinmunes, debido especialmente a la presencia de alteraciones en su activación y regulación (1).

La activación fisiológica de estos LT depende de al menos dos señales de activación provenientes de la célula presentadora de antígeno (CPA) (2). La primera de estas señales se relaciona con la especificidad para la activación de la célula T, en la cual se relacionan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el receptor de la célula T (TCR). Esta señal primaria, aunque siempre necesaria, no es suficiente para inducir la activación de los LT. Debido a esto, los LT requieren de una segunda señal (coestimulación) para lograr su completa activación. De lo contrario, una célula T carente de señales coestimuladoras adecuadas puede tomar diversos destinos, desde simplemente ignorar la presentación antigénica, volverse en una célula T anérgica (estado refractario en la cual es incapaz de activarse a pesar de recibir señales coestimuladoras adecuadas) o incluso presentar apoptosis (Figura 1) (2).

Estas señales coestimuladoras son múltiples y al hacer parte de la activación y regulación de los LT, permiten pensar que mediante su manipulación existan diferentes opciones terapéuticas tendientes a atenuar la respuesta inmune en diversos enfermedades autoinmunes (ver Capítulo 10).

La vía coestimuladora B7: CD28/CTLA-4

Entre numerosas señales coestimuladoras analizadas, la vía B7: CD28/CTLA-4 es reconocida por su importante participación en el proceso de estimulación y regulación de LT (3). Esta vía consiste de moléculas que actúan como ligandos coestimuladores expresados en la CPA, el B7-1 (CD80) y el B7-2 (CD86) unidos a dos receptores en la célula T, el CD28 y el CTLA-4 (cytotoxic T- lymphocyte-associated antigen 4 o CD152).

La expresión de esta vía coestimuladora favorece la activación de los LT cuando el ligando es CD80 o CD86, y el receptor es CD28, lo que se traduce en la secreción de citoquinas, expresión de diversos receptores e incluso, la expresión de genes para su supervivencia. Existen, sin embargo, diferencias sustanciales entre los componentes de esta vía que se deben precisar. Primero, el receptor CD28 se expresa en LT en estado de reposo e inicia su activación, mientras que el receptor CTLA-4 se expresa exclusivamente en LT activados (horas o días después); segundo, la afinidad de las señales coestimuladoras B7 es muy superior por el receptor CTLA-4 (entre 500 y 2500 veces más) por lo que éste se considera el receptor predominante; tercero, el CTLA-4 a diferencia del CD28, puede actuar como regulador al transmitir una señal inhibitoria y de este modo terminar con la activación del LT; y cuarto, el CTLA-4 se expresa constitutivamente en LT reguladores (3) (Tabla 1).

Este mecanismo regulatorio del CTLA-4 es complejo (4), tiene un efecto competitivo directo con el CD28, inhibe la liberación de IL-2 y estimula la de IL-10 y factor de crecimiento y transformación β (TGF-β) (ver Capítulo 10). Además, se considera que la estimulación del CD28 favorece la liberación de balsas lipídicas (lipid rafts) del medio intracelular a la superficie, lo que favorece la activación celular, mientras que el CTLA-4 interfiere con la liberación de estas balsas. Recientes estudios indican que estas balsas lipídicas poseen en su interior importantes dominios de señalización celular y su modulación afecta de manera sustancial la actividad de los LT. Es por esto que el CTLA-4 al interferir con la expresión de estas balsas lipídicas regula la activación de los LT. De aquí que, la depleción o alteración de este receptor CTLA-4 ha sido relacionado ampliamente con el desarrollo de autoinmunidad (2-3).

Tabla 1. Características de la vía coestimuladora B7: CD28/CTLA-4.

Características	CD28	CTLA-4
Afinidad por B7	+	++++
Expresión en LT	LT en reposo	LT activados
Liberación intracelular de balsas lipídicas	+++	—
Acción sobre LT	Activador	Regulador/inhibidor

LT: linfocito T

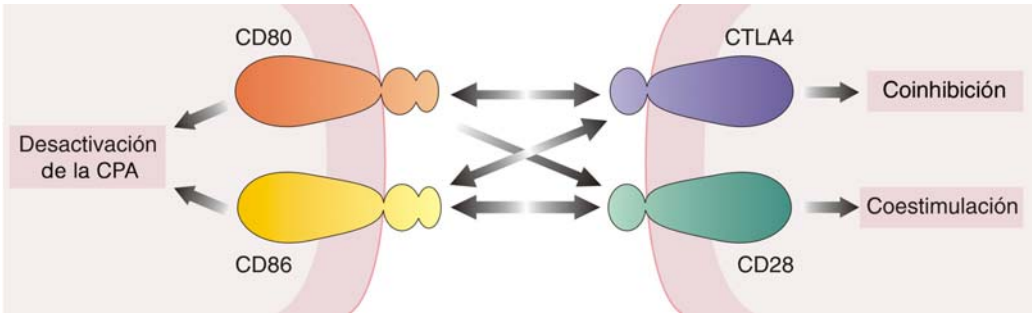


Figura 1.
Vía de coestimulación B7:CD28-CTLA4.
La interacción de receptores en la vía B7/CD28-CTLA-4 puede representar distintas señales para la activación del linfocito T y de células presentadoras de antígeno (CPA). Si el ligando es CTLA-4 se presenta inhibición; si por el contrario, el ligando es CD28 se produce estimulación.

Adicionalmente, se ha observado que la expresión de una variante alélica del genoma del gen del CTLA-4 ubicado en la región 2q33 se corelaciona con patologías como la enfermedad de Graves, la diabetes mellitus tipo 1 y el hipotiroidismo autoinmune (5-6). Por esta relación es que existe gran interés en conocer con mayor precisión las intrincadas bases bioquímicas de la señalización del CTLA-4 y las oportunidades reales de manipular este receptor con el fin de atenuar la activación de LT en diferentes enfermedades autoinmunes (7).

Si bien mediante la manipulación del CTLA-4 se puede bloquear la señal coestimuladora provista por CD80 y CD86; se sabe que en caso de suministrar el propio CTLA-4 se presentaría un rápido aclaramiento de éste en la circulación, lo cual fue motivo para que sus propiedades farmacodinámicas se mejoren por medio de su unión con la región constante de la cadena pesada de la Inmunoglobulina (Ig) G_1 (8), con lo cual se conforma la sustancia CTLA-4Ig denominada abatacept.

Esta proteína de fusión recombinante se ha creado por la unión genética del dominio extracelular humano del CTLA-4 a los dominios CH_2 y CH_3 de la región constante de la cadena pesada de la IgG_1 (3) La expresión del plásmido que contiene el cDNA del CTLA-4 fue transfectado en células ováricas de hamster chino y mediante procesos de purificación se estableció una línea celular de alta concentración de esta proteína (3). De este modo, el CTLA-4Ig se une al B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) de las CPA, realizando así un importante efecto competitivo que impide la unión de estas moléculas coestimuladoras al receptor CD28 y por tanto la célula T no se activa de forma adecuada (Figura 2) (9).

Por tanto, existe un creciente interés en esta proteína de fusión recombinante CTLA-4Ig, que ha sido estudiada en diversos modelos animales de enfermedad autoinmune (10-11) y además ha probado ser útil en prevenir el desarrollo de respuesta inmune en modelos murinos de trasplante de islotes pancreáticos, así como por prolongar la supervivencia del injerto cardíaco en ratas (12-13). Incluso, ha demostrado que puede prevenir el desarrollo de artritis en ratas BB susceptibles (14) e inhibir la respuesta celular mediada por LT en pacientes con psoriasis (15).

Así mismo, la administración de CTLA-4Ig modifica el patrón de expresión de citoquinas Th2, al disminuir la liberación de interleuquina (IL) -4 en modelos animales de infección por leishmania (16). En pacientes con artritis reumatoide (AR), entidad autoinmune en la que los LT activados desempeñan un importante papel en su fisiopatología, se ha evaluado el CTLA-4Ig con resultados alentadores. En el primer estudio de CTLA-4Ig en pacientes con AR (17), se tomaron 214 pacientes con esta enfermedad según el criterio del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (18), que permanecían con actividad de la enfermedad a pesar del uso de al menos un fármaco modificador de la enfermedad (DMARD). Se suministró CTLA-4Ig y una molécula similar LEA29Y en

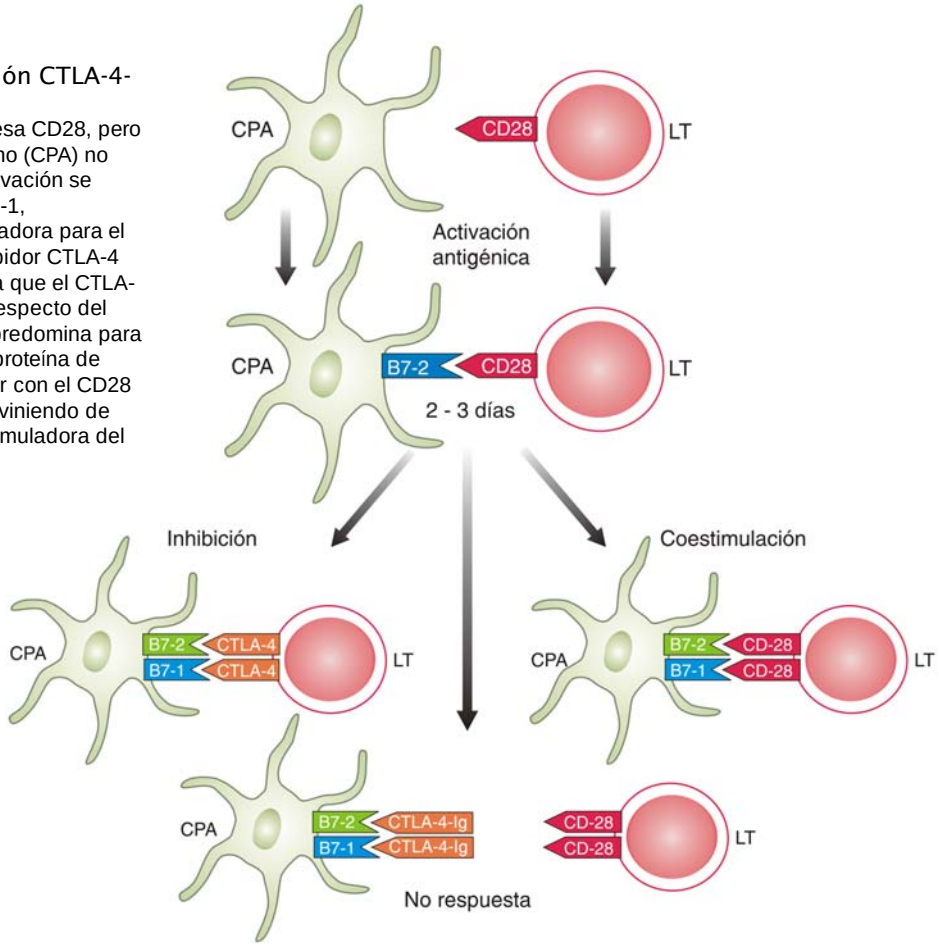


FIGURA 2.
Papel de la proteína de fusión CTLA-4-Ig en la activación de LT.
El linfocito T (LT) en reposo expresa CD28, pero la célula presentadora de antígeno (CPA) no expresa B7. A las 6 horas de activación se expresa B7-2 y a las 48 horas B7-1, trasmitiendo una señal coestimuladora para el LT. El LT expresa el receptor inhibidor CTLA-4 48 a 72 horas después. Debido a que el CTLA-4 une al B7 con mayor afinidad respecto del CD28, su interacción inhibitoria predomina para regular la respuesta inmune. La proteína de fusión CTLA-4–Ig puede competir con el CD28 y CTLA-4 por la unión de B7, previniendo de esta manera la interacción coestimuladora del CD28.

diferentes dosis (0,5-2-10mg/kg), comparadas con placebo. Se realizó seguimiento hasta por 85 días luego de la primera infusión (infusión en días 1, 15, 29 y 57 del estudio) y se evaluó la respuesta clínica según los criterios del ACR y también el desarrollo de posibles efectos colaterales. Se observó un mayor porcentaje de respuesta ACR 20* al final del seguimiento en el grupo que recibió mayor dosis de CTLA-4Ig y LEA29Y (23%, 44% y 53%, respectivamente), así como un menor porcentaje de reactivación de la artritis. El CTLA4Ig demostró un perfil de seguridad satisfactorio, a pesar que en un paciente que recibió la dosis de 2mg/kg se reportó artritis séptica, posiblemente relacionada con el producto.

Otro estudio (19), comparó el efecto del CTLA-4Ig en diferentes dosis (2 y 10 mg/kg), respecto del placebo, en pacientes con artritis reumatoide con inadecuada respuesta al metotrexate. El CTLA-4Ig fue suministrado en una infusión de 30 minutos los días 1, 15, 30 y luego mensualmente por 6 meses. Luego de 6 meses, la respuesta ACR 20 fue alcanzada por el 60% de pacientes que recibieron 10mg/kg de CTLA-4Ig y por el 41.9% de los que recibieron la dosis inferior. No se reportaron muertes ni infecciones oportunistas durante el seguimiento y tampoco seroconversión para anticuerpos antiCTLA-4Ig durante estos 6 meses. No obstante, aún no se ha estudiado junto con otras terapias biológicas en el manejo de la AR (p.ej. terapias antifactor de necrosis tumoral alfa - TNF-α), lo que es importante para evaluar superioridad o un posible efecto sinérgico que represente mayor beneficio para los pacientes con esta enfermedad.

El potencial terapéutico de sustancias modificadoras de esta vía coestimuladora en pacientes con AR y en modelos animales de trasplante de aloinjerto, ha permitido su estudio en otras patologías de etiología diversa, como son la granulomatosis de Wegener, la infección por virus de hepatitis B y en glomerulonefritis por anticuerpos antimembrana basal glomerular.

En granulomatosis de Wegener, proceso vasculítico de etiología desconocida, caracterizado por una respuesta inmune controlada por una variedad de citoquinas, moléculas coestimuladoras y coinhibidoras, se ha evaluado el papel del CTLA-4 (20), y encontrado asociación con algunos alelos funcionales de su gen con la enfermedad (ver Capítulo 10). De este modo, se considera que la intervención terapéutica con CTLA-4Ig puede ser útil.

Así mismo, se ha postulado un papel regulatorio en la recuperación de la infección en pacientes con hepatitis B (21) y en disminuir el deterioro funcional renal en modelos murinos de glomerulonefritis por anticuerpos anti-membrana basal glomerular (22). También se ha evaluado su efecto en modelos murinos de nefritis lúpica, obteniendo buenos resultados por lo que se constituye en una terapia promisoria para el manejo de esta entidad (23).

* ACR 20, 50 y 70 denota el porcentaje de mejoría clínica y paraclínica alcanzado en artritis reumatoide según el criterio del Colegio Americano de Reumatología.

El sistema CD2 – LFA3

Luego de la activación antigénica, los LT con receptores de alta afinidad se convierten en células de memoria, se dirigen a órganos linfoides secundarios en busca de antígenos y expresan de manera abundante el marcador de superficie CD2, el cual se une al LFA-3 (leukocyte- function - associated antigen type 3), una molécula que actúa como ligando de las CPAs (24), claves para la presentación antigénica y posterior proliferación de LT. Debido a esto ha sido objeto de estudio en enfermedades autoinmunes como la psoriasis.

En la psoriasis, trastorno inflamatorio de la piel, a menudo severo y difícil de tratar, se presenta un infiltrado linfocitario que en su gran mayoría expresa el marcador de célula T de memoria CD45RO+ y el marcador de superficie CD2. Al bloquear la unión del CD2 y LFA3 se disminuye la activación de LT (25). Este bloqueo se consigue mediante la administración de alefacept, proteína de fusión recombinante producto de la unión del LFA-3 humano y la región constante de la IgG_1, bloqueando la interacción entre LFA-3 y CD2 tanto *in vivo* como *in vitro*, modificando de esta manera el proceso inflamatorio (26-27-28). Incluso, una vez unido al CD2, el alefacept puede inducir apoptosis de los LT *in vitro*, mediante la unión de su fracción IgG_1 al receptor CD16 (FCγRIII) presente en las células asesinas naturales (Natural Killer -NK) (Figura 3).

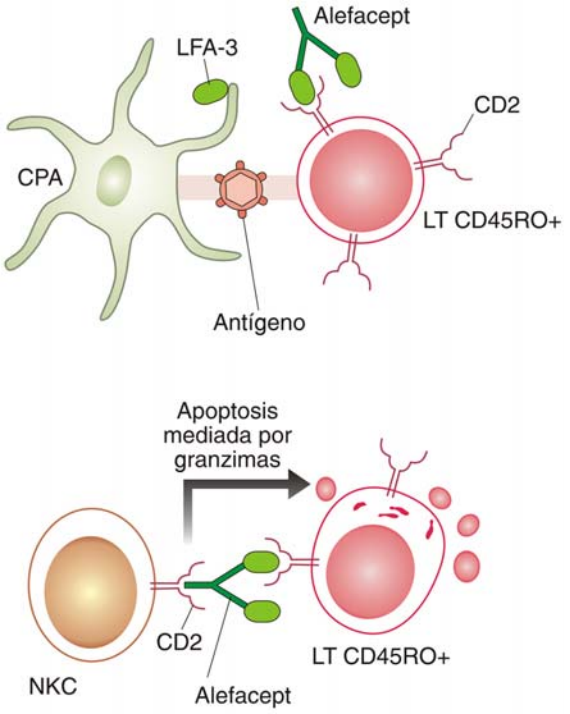


FIGURA 3.
Mecanismo de acción de Alefacept.
El alefacept bloquea la interacción coestimuladora entre LFA-3 (leukocyte-function-associated antigen type 3) en las células presentadoras de antígeno (CPA) y CD2 en LT de memoria (CD 45RO+), previniendo la activación. *In vitro*, la porción Fc del alefacept puede unirse al receptor CD16 en células asesinas naturales (NKC) llevando estos LT a apoptosis.
Adaptado de ref. 25.

Este alefacept ha sido evaluado clínicamente en pacientes con lesiones crónicas psoriáticas de muy difícil manejo (29). En este estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo se tomaron 229 pacientes, subdivididos en 4 grupos para recibir alefacept por 12 semanas en 3 dosis diferentes (0.025, 0.075 o 0.150 mg/kg/sem EV) o placebo. Se evaluó la respuesta al tratamiento según el índice de severidad y área comprometida. Al final del tratamiento, se observó una mayor respuesta en los que recibieron alefacept (38, 53 y 53% en los grupos que recibieron 0.025, 0.075 y 0.15mg/kg, respectivamente), comparado con el grupo placebo (p=0,001). Esta diferencia significativa se mantuvo hasta el final del seguimiento, programado para doce semanas (p=0.02). Alefacept redujo el conteo periférico de LT de memoria (CD45RO+) lo que se correlacionó con la mejoría de las lesiones psoriáticas, sin encontrarse por esta mejoría una diferencia significativa en la tasa de infección entre los grupos de alefacept y placebo. Ha demostrado además, ser no inmunogénico (30), bien tolerado, sin representar un riesgo mayor de infección o malignidad, y proveer un adecuado control de los síntomas hasta por 7 meses luego de la suspensión del producto (31,32). El alefacept no altera la posterior respuesta inmune de los LT de memoria (CD45 RO+), frente a antígenos nuevos ni ya conocidos (33). De esta manera el alefacept se aprobó por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU para su uso en psoriasis, desde enero 2003 (34).

También ha sido evaluado en artritis psoriática (35), en donde demostró reducción significativa del conteo tanto de LT CD4, CD8 y macrófagos en muestras de tejido sinovial, logrando notable mejoría de las lesiones cutáneas. Incluso, un pequeño grupo de pacientes en este estudio alcanzó el criterio de respuesta ACR 50.

Sistema LFA-1 – ICAM-1

El mayor conocimiento de la fisiopatología de la psoriasis ha permitido el reconocimiento de otras moléculas que participan en la activación y proliferación de los LT. De este modo, se ha estudiado la molécula LFA-1 (leukocyte -function-associated antigen type 1), que es expresada sólo por leucocitos y que a través de su unión con moléculas de adhesión intercelular (ICAM)-1 y 2, es importante en los procesos de extravasación y migración que los LT deben realizar para llegar a los tejidos y subsecuentemente ser activados por la CPA (36). En la psoriasis, el reclutamiento de LT provenientes de la sangre, depende de la interacción de varias moléculas, entre ellas el antígeno cutáneo linfocitario (CLA), selectina-E, receptores de quimioquinas CCR4 y CCR10 y el LFA-1, el cual interactúa preferentemente con ICAM-1 en las vénulas postcapilares de la piel (37). El efalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado se une a la subunidad alfa del LFA-1 (CD11a) y bloquea su unión con el ICAM-1 (Figura 4).

Esta particularidad lo diferencia del alefacept, ya que disminuye la activación celular sin depletar el conteo de LT de memoria.

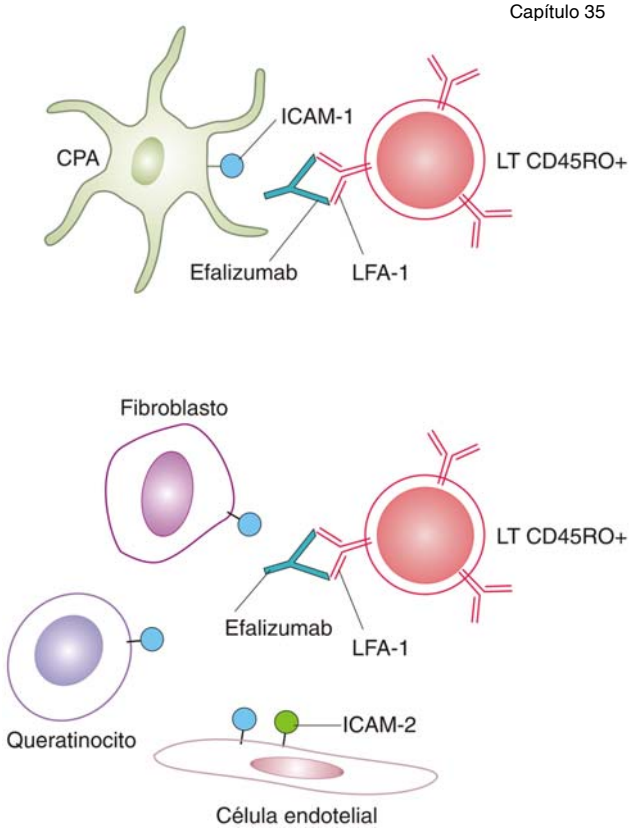


FIGURA 4.
Mecanismo de acción de efalizumab.
El efalizumab se une a la subunidad CD11a del LFA-1 (leukocyte-function-associated antigen type 1) y por tanto interfiere con la interacción coestimuladora de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) presente en células presentadoras de antígeno (CPA). DE esta manera el efalizumab inhibe la activación de LT. También afecta las interacciones de LT con ICAM-2 y otros ligandos en queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, interfiriendo en el movimiento de LT en lesiones psoriáticas. Adaptado de ref. 25.

Los efectos biológicos de este anticuerpo han sido probados en diferentes estudios fase 1 y 2 (38-39-40), así como en otros estudios fase 3 (41-42-43).

El mayor estudio involucra 597 pacientes en un diseño multicéntrico, doble ciego, aleatorizados para recibir efalizumab por doce semanas (1 ó 2 mg/kg/semana) o placebo (44).

Los resultados se evaluaron al término inicial de las 12 semanas por el índice de severidad y área comprometida. Se encontró mejoría del 75% en los grupos que recibieron efalizumab (22 y 28% para los grupos que recibieron 1 y 2mg/ kg/ semana, respectivamente), comparado con sólo el 5% del grupo placebo (p=0.001). De acuerdo a la respuesta clínica, los pacientes eran aleatorizados nuevamente para recibir efalizumab o placebo por 12 semanas adicionales.

Posteriormente, a la semana 24, se realizó una nueva evaluación encontrando mejoría persistente en el 77% del subgrupo que había presentado la mejor respuesta y que continuó recibiendo el efalizumab. Luego de esta evaluación, se suspendió el efalizumab en todos los grupos y se evaluó en la semana 36, persistiendo la mejoría en cerca del 30% de pacientes que en principio habían respondido

más del 50%. Además de su eficacia, el efalizumab demostró ser bien tolerado, con pocos efectos adversos. Finalmente, el efalizumab fue aprobado por la FDA para su uso en psoriasis en octubre del 2003.

Regulación de la actividad de la Interleuquina-1

La IL-1 es un citoquina inflamatoria por excelencia (45). Esta citoquina se ha relacionado ampliamente con la patogénesis de la AR, tanto en modelos animales como en humanos (46). De esta manera, la inhibición de IL-1 ha sido relacionada con mejoría clínica en pacientes con AR. El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) se expresa naturalmente y se comporta como un inhibidor específico de esta citoquina, al bloquear la unión de IL-1 con su receptor fisiológico (IL-1R) (47). El balance entre la expresión de IL-1 y IL-1Ra ha demostrado ser muy importante en diversos estados fisiopatológicos estudiados en modelos animales. Se requiere de una relación 100:1 entre el IL-1Ra y la IL-1 para que se produzca el bloqueo de la actividad de este último (48). De este modo, se ha realizado un análisis cuantitativo de muestras de líquido sinovial en pacientes con AR, demostrando que estos pacientes poseen bajos niveles de IL-1Ra, insuficientes para contrarrestar la actividad de IL-1. Por tanto, la administración de IL-1Ra restaura este balance y disminuye la actividad de la enfermedad en pacientes con AR. El anakinra, una molécula semejante al IL-1Ra, producida por tecnología de DNA recombinante utilizando el sistema de expresión de la bacteria E. Coli (49), difiere del IL-1Ra humano nativo por la adición de un residuo de metionina en su porción terminal. Posee una biodisponibilidad del 95%, una vida media entre 4 y 6 horas, lo cual hace necesario su aplicación diaria. Posee un rápido inicio de acción (1 semana) (50) y recibió la aprobación por la FDA (Food and Drugs Administration) en Noviembre 2001 para su uso subcutáneo en pacientes con AR (100mg/día).

La eficacia de anakinra ha sido validada en una serie de estudios clínicos. En Europa, se comparó la efectividad de la monoterapia con anakinra respecto del placebo en 472 pacientes con AR (51). Luego de un período de por lo menos 6 semanas de suspensión de cualquier DMARD, se dividieron los pacientes en 4 subgrupos para recibir placebo o anakinra en 3 dosis diarias distintas (30mg, 75mg y 150mg). Se encontró que, una mayor proporción de pacientes en el subgrupo que recibió 150mg/día de anakinra presentó la mejor respuesta ACR 20 (43% de pacientes). Esta mejoría se alcanzó rápidamente (menos 2 semanas) y se mantuvo hasta el final del seguimiento (48 semanas).

En otro estudio, se evaluó la acción de anakinra en asocio con metotrexate (52), el cual debía recibirse al menos 6 meses antes y permanecer en una dosis estable durante los 3 meses previos. En total 419 pacientes participaron del estudio para recibir placebo o anakinra (0.04, 0.1, 0.4, 1.0 y 2mg/kg día SC), a las 12 semanas se observó una respuesta ACR 20 significativa en los 5 subgrupos de anakinra comparado con el placebo ($p=0.001$), siendo mayor en los grupos de 1mg/kg (46%) y 2mg/kg (38%). Basados en la eficacia reportada en este estudio se propuso la dosis de 100mg/día SC como la más apropiada para el manejo de pacientes con AR.

En general, anakinra fue bien tolerado en los estudios analizados tanto como monoterapia y cuando fue asociado con metotrexate. No se reportaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de infección entre los grupos de anakinra y el grupo control.

Adicional a IL-1, el TNF-α es otra citoquina de reconocida importancia en la fisiopatología de la AR. Por eso, otros estudios de interés evaluaron el uso de anakinra en pacientes que persistían con AR activa pese al uso de un producto con actividad antiTNF-α, etanercept (receptor soluble p75 del TNF-α) 25mg, 2 veces por semana (53). En un estudio piloto de seguridad en 58 pacientes, anakinra fue adicionado a dosis de 1mg/kg. Cerca de la mitad de pacientes (48%) presentaron un episodio infeccioso, incluso requiriendo en 4 de ellos hospitalización. Todos estos episodios se resolvieron finalmente con antibióticos.

En otro estudio, el uso concomitante de anakinra y etanercept no ha demostrado beneficios en el manejo de la AR y por el contrario aumentó el número de efectos adversos (54). Otros estudios sugieren que en pacientes con AR que han tomado y posteriormente suspendido terapias biológicas con actividad antiTNF-α (etanercept), pueden beneficiarse del uso de anakinra (55).

El impacto del anakinra en la progresión radiográfica de la enfermedad erosiva, ha sido analizado con buenos resultados, en los que parece tener un efecto protector del hueso y cartílago (56).

Adicional a su importancia en el manejo de la AR, este antagonista del receptor de IL-1 ha sido evaluado en pacientes con enfermedad de Still del adulto (57-58), espondilitis anquilosante (59) y artritis lúpica severa refractaria (60-61). En todos estos casos los resultados son promisorios.

Por último, a pesar de estudios recientes que corroboran el beneficio clínico del uso de anakinra junto con el metotrexate en pacientes con AR (62), debido a ciertas desventajas en su farmacodinamia, como su corta vida media y la necesidad de altas dosis para bloquear el 90% de los receptores de IL-1, se encuentran en estudio otros productos que antagonizan la acción de esta citoquina. Ejemplos de estos productos son anticuerpos monoclonales antiIL-1, inhibidores de enzima convertidora de IL-1 (ICE) y receptores solubles IL-1.

Por ahora, aunque ha demostrado efectividad en el manejo de AR, el papel más apropiado del anakinra en esta enfermedad está por definirse a la luz de nuevos estudios más específicos, los cuales también pueden ayudar a establecer su función en otras patologías (63).

Regulación de la actividad de la Interleuquina-6

La interleuquina 6 es una glicoproteína con diversos efectos biológicos (64), producida por LTh2 y también en otra

amplia gama de células del sistema inmune y células mesenquimatosas (entre las que se incluyen sinoviocitos y fibroblastos). De allí que esta citoquina haya recibido diferentes nombres desde su descubrimiento, los cuales se unificaron cuando se verificó que todas estas actividades estaban ligadas al mismo gen en el cromosoma 7. Posee similitud estructural y funcional con otras citoquinas con las cuales forma la superfamilia de la IL-6 (65) (Figura 5). La IL-6 en el sistema inmune estimula la diferenciación de células B en plasmocitos y la posterior producción de inmunoglobulinas. Además, estimula la proliferación de LT citotóxicos, potencia el papel lesivo de los osteoclastos en las articulaciones, actúa como pirógeno endógeno favoreciendo la pérdida de peso y es importante en la respuesta inflamatoria de fase aguda por su acción sobre los hepatocitos. A pesar de reportes en los que figura como una citoquina regulatoria, al documentarse ciertas propiedades antiinflamatorias por la supresión de IL-1 y TNF-α (66), se considera como una importante promotora de la inflamación sinovial como fue demostrado en modelos murinos de artritis inducida, en los cuales los ratones knockout (KO) IL-6 -/- fueron incapaces de desarrollar el compromiso articular a pesar de expresar niveles normales de IL-1 y TNF-α. Para confirmar este mecanismo se suministró IL-6 a estos mismos ratones KO, observando desarrollo de la enfermedad.

De un modo similar, la IL-6 es una de las citoquinas con mayor concentración tanto en el suero como en el líquido sinovial de pacientes con AR activa respecto de los controles (67). Así mismo, mayores niveles de IL-6 y su receptor han sido encontrados en el líquido sinovial respecto del suero, lo que sugiere la producción local de esta citoquina por parte de la sinovia reumatoide.

El efecto del bloqueo de IL-6 ha sido analizado en modelos animales de AR como el ratón DBA/1J, mediante la administración del anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de IL-6 (MR16-1) en los días 0, 3, 7 y 14 luego de la inyección de colágeno bovino tipo II, el cual produce artritis destructiva en estos ratones. Este MR16-1 fue capaz de evitar el patrón destructivo articular sólo cuando fue administrado de forma temprana (0 y 3 días), sin observarse ningún beneficio en su administración posterior. Esto sugiere fuertemente que el papel preponderante de la IL-6 se presenta en los estadios más tempranos de la enfermedad (68).

En humanos se ha evaluado la eficacia de MRA, anticuerpo monoclonal humanizado que consta de la porción Fc de IgG_1 unido al receptor de IL-6 (IL-6R). En un estudio de 164 pacientes (69), se emplearon dosis diferentes de MRA (4 u 8mg/kg) versus placebo y se demostró la eficacia de MRA al cumplirse el criterio de respuesta ACR 20 en el 78% de pacientes del grupo que recibió 8mg, comparado con sólo el 11% del grupo placebo. En este estudio el MRA fue bien tolerado y corroboró la eficacia reportada en otros estudios previos (70). El MRA ha sido evaluado recientemente como monoterapia para AR, comparado a su administración en conjunto con el metotrexate. Se involucraron 395 pacientes divididos en 7 grupos: 3

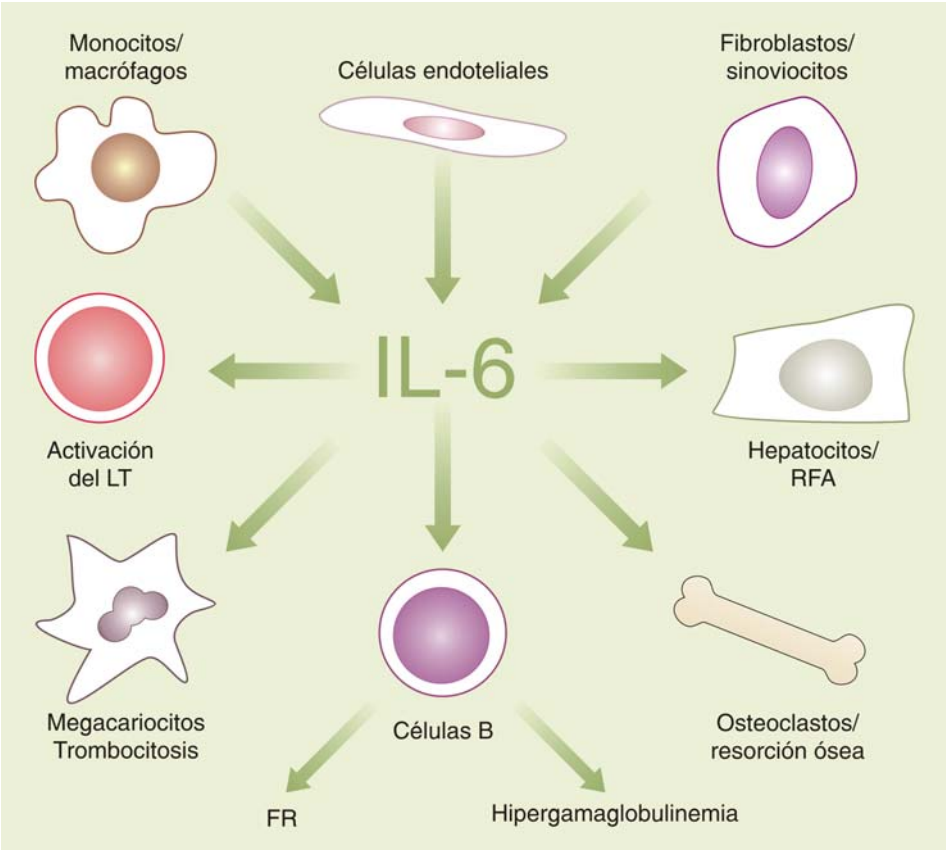


Figura 5.
Papel pleiotrópico de la IL-6 en la Artritis Reumatoide.
RFA: Reactante Fase Aguda; LT: Linfocito T.
Adaptado de ref. 68.

con MRA a diferentes dosis (2, 4 y 8mg/kg) con y sin metotrexate, comparado con el grupo placebo y metotrexate (10 -25mg/kg/sem). En general se demostró mayor eficacia en todos los grupos que recibieron MRA y parece que al usarse en conjunto con el metotrexate este beneficio se hace más evidente. Se reportaron 10 eventos adversos importantes en los grupos de MRA: 5 casos de infecciones serias y 5 reacciones de hipersensibildad, los cuales se resolvieron adecuadamente.

Adicionalmente, el MRA ha sido usado en pacientes con artritis reumatoide juvenil (71), enfermedad de Castleman (72) y anemia hemolítica autoinmune refractaria (73), logrando resultados alentadores.

Regulación de la actividad de la Interleuquina-12

La interleuquina 12 es una citoquina heterodimérica que actúa como un potente inductor de la respuesta inflamatoria mediada por los LTh1. Promueve citotoxicidad, producción de IFN-γ y proliferación de NK. Además, diferencia los LB en células plasmáticas productoras de anticuerpos, favoreciendo el cambio de isotipo a IgG_2 por intermedio del IFNγ (74). También ha demostrado una gran actividad antitumoral, según evaluaciones realizadas en ratones al inducir potentes rechazos de células tumorales. Al asociarse con IL-15, se presenta un efecto antitumoral sinérgico (75). Está relacionada con la respuesta inmune dirigida contra bacterias, hongos y protozoos, pero igualmente participa en la fisiopatología de diversos procesos autoinmunes como la enfermedad de Crohn. En esta condición inflamatoria autoinmune, las CPA en el intestino producen IL-12 favorecidas por la presencia de IFN-γ y TNF-α. Una vez presente, esta citoquina es responsable del desarrollo de granulomas y el engrosamiento de la pared intestinal característico de la enfermedad (76).

En modelos murinos de enfermedad de Crohn, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a IL-12 se ha demostrado regresión de la colitis ya establecida, e incluso si es suministrado en estadios iniciales ha podido prevenir en parte el desarrollo de la respuesta inmune (77).

Recientemente en pacientes con enfermedad de Crohn, se evaluó el papel de un anticuerpo dirigido a la IL-12. En este estudio (78), realizado para evaluar seguridad y efectividad, se utilizó un anticuerpo humano, recombinante, modificado genéticamente para reconocer la IL-12. Este ensayo doble ciego, incluyó a 79 pacientes con enfermedad de Crohn activa, aleatorizados en dos cohortes para recibir siete semanas de tratamiento. Cada una de estas cohortes fue subdividida en tres grupos que recibían diferente manejo, un grupo recibió el anticuerpo antiIL-12 a dosis de 1mg EV, el segundo a 3mg y el tercero recibió placebo. La segunda cohorte recibió el anticuerpo semanalmente sin interrupción, a diferencia de la segunda cohorte que recibió la segunda dosis del anticuerpo cuatro semanas después de la primera dosis, para luego continuarlo cada semana, hasta completar las siete dosis propuestas. Se vieron los resultados al final del tratamiento de cada cohorte y al final del seguimiento programado para 18 semanas. En general, se observó mayor respuesta clínica evaluada por CDAI (Crohn Disease Activity Index) con el esquema initerrumpido de 3 mg EV semanal (75% vs. 25% de placebo, p=0.03). Sin embargo, al final del seguimiento, esta diferencia dejó de ser significativa (69% vs. 25%, p=0.08). Entre los otros grupos no se presentaron diferencias significativas y, excepto por un aumento en el número de reacciones locales, no hubo diferencia con respecto los efectos adversos entre el grupo placebo y los que recibieron el anticuerpo.

Regulación de la actividad de la Interleuquina-18

También conocida como *IL-1 familia 4* (IL-1F4), la IL-18 es un miembro de la superfamilia de la IL-1 de más reciente descripción, siendo un gran inductor de interferongama (IFN-γ), por lo cual su actividad y su relación con trastornos autoinmunes se relaciona estrechamente con la actividad de esta última citoquina. Es necesario mencionar que a diferencia de otras citoquinas proinflamatorias como el TNF-α y la IL-1, la administración de IFN-γ a humanos no se relaciona con respuesta inflamatoria sistémica y puede ser utilizada de forma terapéutica en diversas patologías médicas como la lepra en la cual favorece la fagocitosis mononuclear. También se ha reportado su uso en algunas lesiones por quemaduras, cáncer e incluso en AR (79). Este rol terapéutico en AR es interesante y de hecho su uso se encuentra aprobado ya en varios países europeos. Su efecto se debe en parte a la capacidad de suprimir la expresión de IL-1β inducida por prostaglandina E_2. la importancia de la IL-18 en la patogénesis de procesos inflamatorios tanto locales como sistémicos se ha evaluado en diferentes modelos animales, en los cuales se ha observado una disminución de la severidad de la respuesta inflamatoria en ratones carentes de esta citoquina (80).

La fuente principal de la IL-18 son los monocitos y macrófagos. Su producción y liberación es bastante interesante, ya que primero se sintetiza como un precursor inactivo y luego se activa por la acción de la proteina caspasa-1 (ICE - intracellular enzime), la cual a su vez es activada en células estimuladas mediante un proceso de autocatalisis. Este mecanismo de activación de la IL-18 es compartido por la IL-1b (Figura 6).

Una vez activada, la IL-18 induce la producción de IFN-γ a partir de los LT y las NK, por lo que se considera parte del grupo de citoquinas liberadas por LTh1 (TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15). Los receptores de IL-18 se han encontrado en LT y B, NK y células dendríticas (81). No obstante, basado en observaciones en modelos animales, se cree que en estados inflamatorios, la IL-18 posee un mecanismo de acción adicional diferente de la inducción de IFN-γ. Se ha visto que al bloquear la IL-18 se reduce el impacto lesivo sobre órganos específicos (p.ej. hígado) en modelos animales de endotoxemia (82). Este efecto nocivo parece estar relacionado con la sobreexpre-

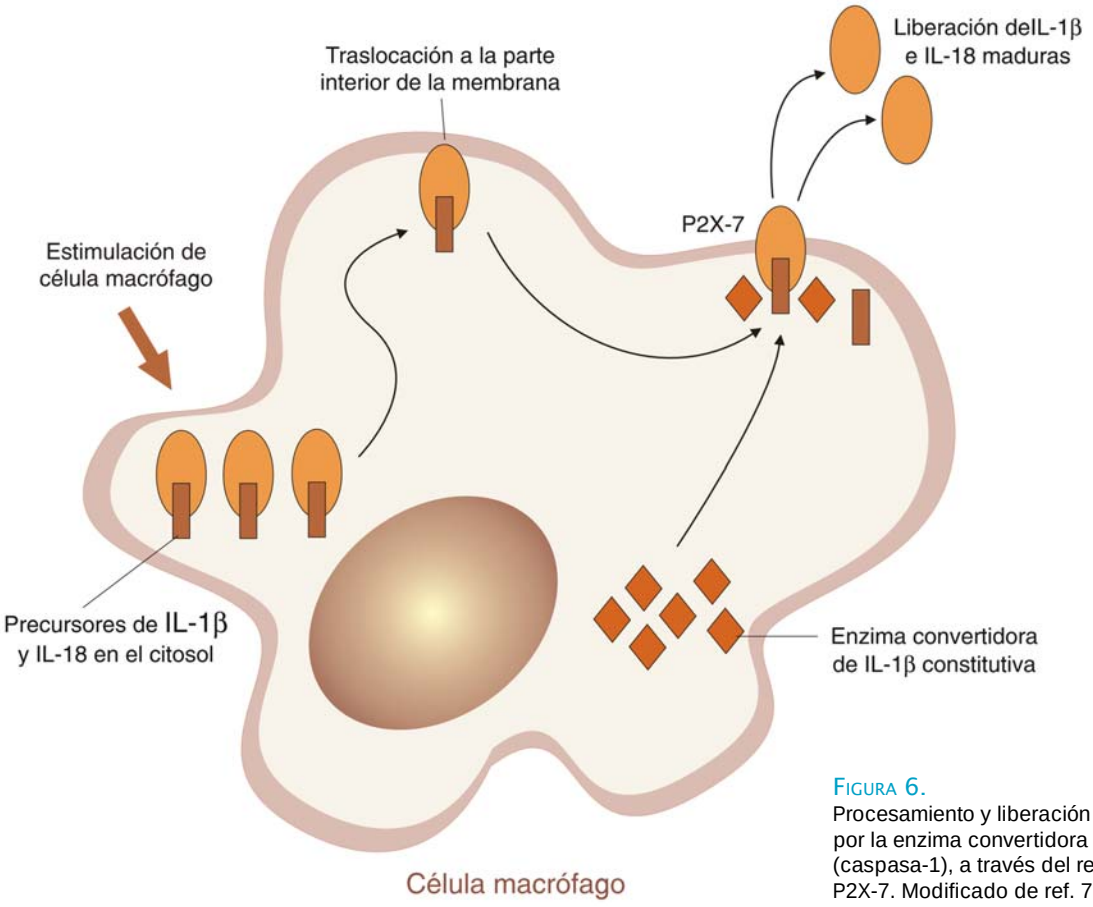


FIGURA 6.
Procesamiento y liberación de IL-1β e IL-18 por la enzima convertidora de IL-1β (ICE) (caspasa-1), a través del receptor activado P2X-7. Modificado de ref. 79.

sión de moléculas de adhesión, mediadores inflamatorios como el óxido nítrico, quimioquinas y activación de neutrófilos (83).

En pacientes con AR, el líquido sinovial ha sido estudiado para IL-18 mediante tinción específica, encontrándose presente en el 80% de los sujetos analizados (84). Incluso su actividad en las articulaciones afectadas de pacientes con AR se ha relacionado con la actividad de la enfermedad (85).

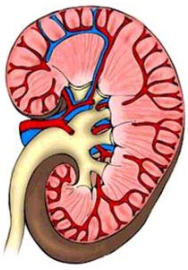
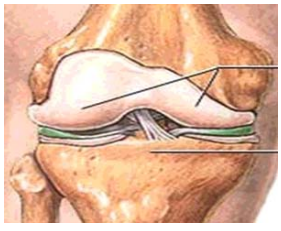
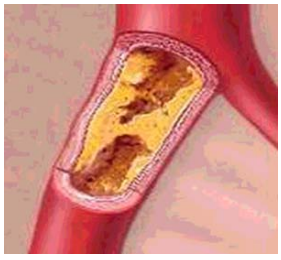
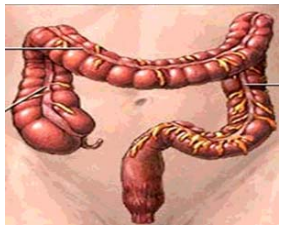
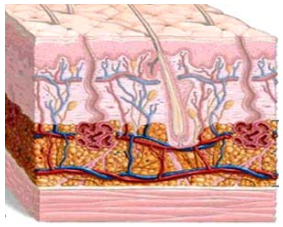
Los estudios iniciales evaluando el potencial terapéutico de neutralizar esta citoquina se realizaron en modelos de artritis inducida en ratones SCW (streptococcal cell wall), a los cuales se les administró un anticuerpo antiIL-18 poco después de la inducción de la artritis. Se observó una notable disminución en la inflamación articular (60%) en los primeros días del estudio, observando igual disminución en los niveles de IL-1 y TNF-α en la articulación. Esta circunstancia sugiere claramente el papel patogénico de la IL-18, el cual también se ha demostrado en modelos deficientes de IFN-γ (86).

La proteína ligadora de IL-18 (IL-18BP) es una molécula que se expresa normalmente y posee una alta afinidad por su ligando, tanto que al unirse lo inactiva. De forma característica sólo liga la IL-18 una vez se encuentre activa, ya que no se une a la molécula inmadura lo cual se ha demostrado por ELISA (87). Por tanto, la IL-18BP ha sido evaluada junto con anticuerpos específicos antiIL-18, al suministrarse en modelos murinos de AIC (artritis inducida por colágeno) ya instaurada clínicamente. Ambas estrategias lograron reducir las manifestaciones clínicas de la enfermedad así como los hallazgos histológicos, sin embargo, en este último parámetro demostró mejor desempeño el anticuerpo antiIL-18.

Regulación de la actividad de otras interleuquinas

La IL-15 es una citoquina que comparte muchas características biológicas con la IL-2. La IL-15 induce proliferación de LT y NK y la liberación de IFN-γ, TNF-α e IL-17 para estimular la actividad citolítica de los LT y la producción de anticuerpos por parte de los LB. Estas características similares se deben a los receptores celulares gama que comparten. Sin embargo, difieren en sus fuentes de producción y las citoquinas por las que son controladas. De este modo, la producción de IL-2 proviene exclusivamente de LT activados y es controlada mediante regulación transcripcional y estabilización de RNAm, en tanto que la IL-15 se produce en una amplia variedad de células y tejidos, siendo regulada al nivel de transcripción, traducción y secreción. Debido a estas diferencias, la IL-15 ejerce diversas funciones en tejidos linfoides y no linfoides, característica no compartida por la IL-2 (88).

En los LT la IL-2 y IL-15 tienen diferentes funciones en la regulación de su apoptosis. Aunque ambas protegen a estos LT de la muerte celular programada mientras se encuentran inactivos, ejercen diferentes papeles una vez que LT se activan por intermedio del TCR. La unión del TCR por estímulo antigénico resulta en la activación y

Enfermedad	Infiltrado	Quimioquina
Sarcoidosis	LT Monocitos	IP-10
Glomerulonefritis 	Monocitos, PMN, LT	MCP-1, RANTES, IP-10
AR Artritis reumatoide, Osteoartritis 	Monocitos, PMN	MIP-1α, IL-8, MCP-1, MIP-1β
Aterosclerosis 	Monocitos, LT	MCP-1, MIP-1α, Eotaxina, IP-10
EII Enfermedad Intestinal Inflamatoria 	Monocitos, PMN, LT, eosinófilo	MCP-1α, IP-10, MIG, GRO-1α
Psoriasis 	PMN, LT, monocitos	MCP-1, IP-10, IL-8, GROβ

expansión de LT y producción de IL-2. No obstante, si se presenta una nueva unión de mayor afinidad antígeno - TCR, se activa la vía apoptótica Fas/Fas ligando (FasL) lo que resulta en muerte celular, mecanismo que restaura la homeostasis celular y preserva la tolerancia inmune. *In vitro*, la IL-2 ha demostrado ser indispensable para lograr esta respuesta apoptótica (89). También in vivo, se ha relacionado con el desarrollo de respuestas autoinmunes en ratones KO IL-2 -/- (90). Por el contrario la IL-15 actúa como un factor de supervivencia para los LT e inhibe la apoptosis dependiente de IL-2 (91-92-93). También se ha demostrado que la deficiencia de IL-15 se relaciona con un reducido número de LT CD8 de memoria (CD45 RO+) (94) y se plantea la posibilidad que la respuesta inicial de LT sea dependiente de IL-15. Incluso, se ha sugerido un papel antitumoral de ambas citoquinas en modelos murinos, corroborado por el hallazgo que sus anticuerpos favorecen el crecimiento de células tumorales (95). Por tanto, anticuerpos monoclonales que reconocen el receptor de IL-2 (IL-2Ra) han sido empleados para inhibir el rechazo de aloinjerto y para tratar leucemia/linfoma de LT (96). Así mismo, terapias dirigidas a la inhibición de IL-15, mediante anticuerpos monoclonales diseñados por ingeniería genética a partir de la *E. Coli* (97), se han propuesto para trastornos autoinmunes como la psoriasis (98).

Otras moléculas que son objeto de creciente interés por su desempeño en diversos estados inflamatorios y autoinmunes son las citoquinas quimiotácticas (quimioquinas), las cuales son esenciales para la atracción de los leucocitos a los tejidos blanco en respuesta a diversos estímulos (99). Su correlación con patologías inflamatorias e inmunes es extensa (Figura 7).

Existe cada vez un mayor conocimiento sobre el rol de las quimioquinas y sus receptores en la fisiopatología de diversas entidades caracterizadas por infiltrados leucocitarios abundantes, en las cuales tienen una importante función en la migración y posicionamiento celular dentro del tejido comprometido. La AR es un ejemplo de este tipo de patologías por lo que las quimioquinas son nuevos objetivos terapéuticos en investigación (100). De la misma manera, en dermatomiositis (DM) se ha caracterizado el inmunofenotipo de las células que infiltran las lesiones cutáneas patognomónicas de esta entidad (signo de Gottron) encontrando un predominio de LT CD4, con un perfil de citoquinas Th1 discretamente mayor, junto con una

Figura 7.
Papel de las quimioquinas en diversos estados inflamatorios.
Cada enfermedad es caracterizada por una selectiva acumulación de leucocitos, proceso controlado por ciertas quimioquinas. LT: Linfocito T; PMN: Polimorfonuclear; IP-10: proteína inducible por interferon 10; MCP-1: proteína quimioatrayente del monocito; RANTES: regulación por activación normal de LT expresados y secretados; MIP: proteína inflamatoria del macrófago; GRO: oncogen regulador de crecimiento; MIG: monoquina inducida por interferon-γ. Modificado de ref. 99.

significante tinción para CXCR3, los cuales posiblemente median un papel patogénico principal en estas lesiones cutáneas (101).

La compleja interrelación entre LT, macrófagos, fibroblastos y otras células del sistema inmune favorece la producción de importantes mediadores inflamatorios como citoquinas y metaloproteinasas de matriz (MMP), moléculas determinantes en la patogenia de entidades autoinmunes como AR. La producción de estas moléculas, sin embargo, se encuentra regulada por otras moléculas encargadas de la señalización intracelular como MAPK (mitogen activated protein kinase) y factores de transcripción. Se han descrito tres subgrupos de MAPK, las quinasas de regulación extracelular (ERK), la c-Jun N-terminal quinasa (JNK/SAPK) y el p38 MAPK. El primer subgrupo es activado en respuesta a factores de crecimiento y hormonas; los dos últimos en respuesta a estrés ambiental y citoquinas proinflamatorias. De este modo, se ha descrito la función de p38 MAPK como mediador inflamatorio en relación a la producción de IL-6 e IL-8 en el fibroblasto del sinovio reumatoide (RSF) (102). Recientemente se evaluó *in vitro* el rol de RWJ 67657, molécula que actúa como inhibidor de p38 MAPK en la producción de mediadores inflamatorios por el RSF, demostrando una disminución significativa de MMP-3 sin alterar la actividad de TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz-1), hallazgo promisorio en el manejo de la AR (103).

En conclusión, la regulación de la actividad de los LT y de algunas interleuquinas parecen ser terapéuticas efectivas en el control de diversas enfermedades autoinmunes (Tabla 2). Un profundo conocimiento de la patogenia de estas enfermedades es necesario para diseñar modelos adecuados de intervención con agentes biológicos.

Tabla 2. Otras terapias biológicas en enfermedades autoinmunes.

Molécula a intervención	Tipo de medicamento	Acción	Beneficios Terapéuticos
CTLA-4	Proteína Recombinante CTLA4 – IgG_1	Bloqueo B7:CD28	AR, GW ?, HBV ? Nefritis lúpica (murino)
LFA-3	Proteína Recombinante LFA3 – IgG_1	CTLA4 – IgG_1	Psoriasis, artritis psoriática
LFA-1	Anticuerpo monoclonal anti LFA-1	Bloqueo LFA-1:ICAM-1	Psoriasis
IL-1	Proteína recombinante semejante al IL-1Ra	Bloquea unión IL-1 – IL-1R	AR
IL-6	Anticuerpo monoclonal IgG_1 – IL-6R	Bloquea unión IL-6 – IL-6R	AR, ARJ, enfermedad de Castleman, AHAI
IL-12	Anticuerpo monoclonal anti IL-12	Bloquea acción IL-12	Crohn
IL-18	Anticuerpo monoclonal anti IL-18	Bloque acción IL-18	AR

AR: Artritis Reumatoide; GW: Granulomatosis de Wegener; HBV: Hepatitis B Virus; ARJ: Artritis Reumatoide Juvenil; AHAI: Anemia hemolítica autoinmune.

Referencias

1 Delves PJ, Roitt I. The immune system. Second of two parts. N Eng J Med 2000;343:108-17

2 Reiser H, Stadecker MJ. Costimulary B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune disease. N Engl J Med 1996;335: 1369-77

3 Kremer JM. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 – immunoglobulin in rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:381-91

4 Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA-4 co-receptor signaling. Nat Rev Immunol 2003;3:544-6

5 Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, et al. CTLA4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. J Immunol 2000; 165:6606-11

6 Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003;423:506-11

7 Radbruch A, Thiel A. Cell therapy for autoimmune diseases: does it have a future? Ann Rheum Dis 2004;63:ii96–ii101

8 Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Update in rheumatology. The fusion protein CTLA4Ig was effective in treating rheumatoid arthritis in patients who had active disease despite taking methotrexate. Ann Intern Med. 2004;141:801-80

9 Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulary activation pathways in transplant rejection. N Eng J Med 1998;338:1813-21

10 Yamashita K, Masunaga T. Long term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA-4Ig gene therapies. Transplantation 2003;76:1089–96

11 Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, et al. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. J Exp Med 1995;181:1145-55

12 Rathmell LH, Jeffrey C. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. J Exp Med 1998;188:199-204

13 Cheung ST, Tsui TY. Liver as an ideal target for gene therapy: Expression of CTLA4Ig by retroviral gene transfer. J Gastroenterol Hepatol 2002;17, 1008–14

14 Knoerzer DB, Karr RW, Schwartz BD, et al.. Collagen induced arthritis in the BB rat: prevention of disease by treatment with CTLA-4Ig. J Clin Invest 1995;96:987-93

15 Lebwohl M, Kang S, Guzzo C, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. J Invest Dermatol 1997;108:S570

16 Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, et al. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. J Immunol 1994;153:4142-8
17 Moreland LW, Aen R, Van den Bosch F, et al. Costimulary blockade in patients with rheumatoid arthritis. A pilot, dose finding, double blind, placebo controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after first infusion. Arthritis Rheum 2002;46:1470-9
18 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24
19 Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis by Selective Inhibition of T-Cell Activation with Fusion Protein CTLA4Ig. N Engl J Med 2003;349:1907-15
20 Zhou Y, Huang D, Paris PL. An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2004; 50:2645-50
21 Thio CL, Mosbruger TL, Kaslow RA et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. J Virol 2004;78:11258-62
22 Okano K, Nitta K, Ogawa S, et al. Effects of double blockade of CD28 and inducible-costimulator signaling on anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. J Lab Clin Med. 2004;144:183-92
23 Cunnane G, Chan OT, Cassafer G, et al. Prevention of renal damage in murine lupus nephritis by CTLA-4Ig and cyclophosphamide. Arthritis Rheum. 2004;50:1539-48.
24 Sandrin MS, Mouhtouris E, Vaughan HA, et al. CD48 is a low affinity ligand for human CD2. J Immunol 1993;151:4606-13
25 Granstein RD. New treatments for psoriasis. N Engl J Med 2001; 345: 284-7
26 Kaplon RJ, Hochman PS, Michler RE, et al. Short course single agent therapy with an LFA-3-IgG1 fusion protein prolongs primate cardiac allograft survival. Transplantation 1996;61:356-63
27 Meier W, Gill A, Rogge M, et al. Immunomodulation by LFA-3TIP, an LFA-3/IgG1 fusion protein: cell line dependent glycosylation effects on pharmacokinetics and pharmacodynamic markers. Ther Immunol 1995;2:159-71
28 Chisholm PL, Williams CA, Jones WE, et al. The effects of an immunomodulatory LFA3-IgG1 fusion protein on nonhuman primates. Ther Immunol 1994;1:205-16
29 Ellis CN, Krueger GG. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. N Engl J Med 2001;345:248-55
30 Krueger G, Vaishnaw A, Akshay L. Alefacept (Human LFA-3/IgG_1 Fusion Protein) is non-immunogenic in two randomized, placebo-controlled phase III trials for chronic plaque psoriasis. J Allergy Clin Immunol 2002;109:S320
31 Krueger G. Current concepts and review of alefacept in the treatment of psoriasis. Dermatol Clin. 2004;22:407-26
32 Pietrzak A, Chodorowska G, Bartkowiak-Emeryk M, et al. Possibilities of using alefacept in the treatment of psoriasis. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska 2003;58:311-3
33 Gottlieb AB, Vaishnaw, Akshay K.. Antibody responses to bacteriophage [phi]X174 and tetanus toxoid are normal in patients receiving alefacept (Human LFA-3/IgG_1 fusion protein). J Allergy Clin Immunol 2002;109: S279
34 Rich SJ, Bello-Quintero CE. Advancements in the treatment of psoriasis: role of biologic agents. J Manag Care Pharm. 2004;10:318-25
35 Dinant, Huibert J, Van Kuijk, et al. Alefacept selectively reduces memory-effector (CD45RO+) T cells and improves clinical outcomes in psoriasis and psoriatic arthritis. J Allergy Clin Immunol 2002;109: 781
36 Leonardi CL. Current concepts and review of efalizumab in the treatment of psoriasis. Dermatol Clin 2004;22:427-35.
37 Kupper TS. Immunologic targets in psoriasis. N Engl J Med 2003; 349:1987-90
38 Gottlieb A, Krueger JG, Bright R, et al. Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. J Am Acad Dermatol 2000;42:428-35
39 Krueger J, Gottlieb A, Miller B, et al. Anti-CD11a treatment for psoriasis concurrently increases circulating T-cells and decreases plaque T-cells, consistent with inhibition of cutaneous T-cell trafficking. J Invest Dermatol 2000;115:333
40 Gottlieb AB, Krueger JG, Wittkowski K, et al. Psoriasis as a model for T-cell-mediated disease: immunobiologic and clinical effects of treatment with multiple doses of efalizumab, an anti-CD11a antibody. Arch Dermatol 2002; 138:591-600
41 Gauvreau, Gail M. The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma. J Allergy Clin Immunol 2003;112:331-8
42 Gordon KB. Efalizumab for patients with moderate to severe plaque psoriasis. JAMA 2003;290:3072-80
43 Nayak A. Efficacy and safety of efalizumab in patients with moderate to severe plaque psoriasis: pooled results from three phase III randomized, placebo-controlled trials. J. Allergy Clin Immunol 2004;113:S335
44 Lebwohl M, Tyring SK, Tiffani K, et al. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. N Engl J Med 2003;349:2004-13
45 Cohen SB. The use of anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist, in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:365-80
46 van de Loo AA, van den Berg WB. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. Ann Rheum Dis 1990;49:238-45
47 Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol 1998;16:457-99
48 Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, et al. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. J Clin Invest 1990;85:1694-7
49 Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. Nature 1990;343:341-6.
50 Schiff MH. Durability and rapidity of response to anakinra in patients with rheumatoid arthritis. Drugs. 2004;64:2493-501.
51 Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. Arthritis Rheum 1998;41:2196-204.
52 Cohen S, Hurd E, Cush J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2002;46:614-24
53 Schiff MH, Bulpitt K, Weaver AA, et al. Safety of combination therapy with anakinra and etanercept in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:S79
54 Genovese M, Cohen S, Moreland L, et al. A randomized double blind controlled study evaluating the safety and efficacy of etanercept vs. etanercept plus anakinra in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2003;50:1412-9
55 Schiff MH, Keystone EC, Gibofsky A, et al. An evaluation of the use of anakinra by rheumatoid arthritis patients previously treated with a TNF inhibitor. Ann Rheum Dis 2003;62:S186
56 Bresnihan B. Effects of anakinra on clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2002;61:ii74–ii77
57 Godinho F, Santos MJ, Canas da Silva J. Refractory adult onset Still's disease successfully treated with anakinra. Ann Rheum Dis 2004; doi10.1136/026617
58 Verbsky JW, White AJ. Effective use of the recombinant interleukin 1 receptor antagonist anakinra in therapy resistant systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2004;31:2071-5
59 Tan AL, Marzo-Ortega H, O'Connor P, et al. Efficacy of anakinra in active ankylosing spondylitis: a clinical and magnetic resonance imaging study. Ann Rheum Dis 2004;63:1041–45
60 Ostendorf B, Iking-Konert C, Kurz K, et al. Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin-1-receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis. Ann Rheum Dis 2004;doi10.1136/025858
61 Moosig F, Zeuner R, Renk C, et al. IL-1RA in refractory systemic lupus erythematosus. Lupus. 2004;13:605-6
62 Cohen S, Moreland LW, et al. A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. Ann Rheum Dis 2004;63:1062–8
63 Furst DE, Breedveld FC, et al. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor a (TNFa) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2004. Ann Rheum Dis 2004; 63:ii2–ii12
64 Roitt, Brostoff, Male. Inmunology. Mosby. Harcourt Brace. 2001
65 Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, et al. Interleukin 6 family of cytokines and gp130. Blood 1995;86:1243–54
66 Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Ann Rev Immunol 1997;15:797-819
67 Houssiau F, Devogelaer JP, Van Damme J, et al. Interleukin 6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum 1988;31:784–8
68 Ernest C. Clinical experience with inhibition of interleukin-6. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:405-15
69 Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial of humanized anti-interleukin-6

receptor monoclonal antibody (MRA) in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2002; 46l:S559
70 Choy EH, Isenberg DA, Garrod T, et al. Therapeutic Benefit of blocking interleuki-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation-trial. Arthritis Rheum 2002;46:3143-50
71 Iwamoto M, Nara H, Hirata D, et al. Humanized monoclonal antiinterleukin-6 receptor antibody for treatment of intractable adult onset Still's disease. Arthritis Rheum 2002;46:3338-9
72 Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. Ann Rheum Dis 2000;59:i21-i27
73 Kunitomi A, Konaka Y, Yagita M, et al. Humanized anti-interleukin 6 receptor antibody induced long-term remission in a patient with life-threatening refractory autoimmune hemolytic anemia. Int J Hematol. 2004;80:246-9
74 Dubois B, Massacrier C, Vandervliet B, et al. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. J Immunol. 1998;161:2223
75 Di Carlo A, Comes S. Basso S, et al. The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement. J. Immunol 2000;165:3111
76 Cominelli F. Cytokine-based therapies for crohn's disease -new paradigms. N Engl J Med 2004;351:2069-79
77 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. J Exp Med 1995;182: 1281-90
78 Mannon PJ, Fuss IJ. Anti–Interleukin-12 antibody for active crohn's disease. N Engl J Med 2004;351:2069-79
79 Dinarello C. Interleukin-18 and the treatment of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin N Am 2004;30:417–34
80 Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, et al. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. J Clin Invest 2001;108:1825-32
81 Gutzmer R, Langer K, Mommert S, et al. Human dendritic cells express IL-18R and are chemoattracted to IL-18. J Immunol 2003,171:6363–71
82 Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulary factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. Infect immun 1995;63:3966-72
83 Wyman TH, Dinarello CA, Banerjee A, et al. Physiological levels of interleukin-18 stimulate muiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. J leukoc Biol 2002;72:401-9
84 Joosten LA, Radstake TR, Lubberts E, et al. Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2003;48:339-47.
85 Yamamura M, Kawashima M, Taniai M, et al. Interferon gamma-inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:275–85
86 Joosten LA, van De Loo S, Lubberts E, et al. An IFN-gamma-independent proinflammatory rol of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. J Immun 2000; 165:6553-8
87 Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. Cytokine 2001;14:334-42
88 Dooms H, Van Belle T, Desmedt M, et al. Interleukin-15 redirects the outcome of a tolerizing T-cell stimulus from apoptosis to anergy. Blood. 2000;96:1006-12
89 Leonardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. Nature 1991;353:858
90 Kramer S, Mamalaki C, Schimpl A, et al. Thymic selection and peptide-induced activation of T cell receptor-transgenic CD8 T cells in interleukin-2-deficient mice. Eur. J. Immunol 1994;24:2317
91 Matthys P, Dooms H, Rottiers P, et al. Induction of IL-15 by TCR/CD3 aggregation depends on IFN-gamma and protects against apoptosis of immature thymocytes in vivo. Clin Exp Immunol. 2002;130:379-85.
92 Marrack P, Bender J, Hilderman D, et al. Homeostasis of TCR-T cells. Nat. Immunol 2000;1:107
93 Waldmann, Dubois, Tagaya. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. Immunity 2001.14:105
94 Kennedy, Glaccum, Brown, et al.Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. J. Exp. Med 2000;191:771
95 Orengo AM, Di Carlo E, et al. Tumor Cells Engineered with IL-12 and IL-15 Genes Induce Protective Antibody Responses in Nude Mice. The Journal of Immunology 2003,171:569–75
96 Waldmann TA. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. J Clin Immunol. 2002;22:51-6
97 Wang P, Wang RT. Preparation and characterization of anti-human IL-15 monoclonal antibody. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2004;20:183-5
98 Louise S, Villadsen M, Schuurman J, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. J Clin Invest. 2003;112:1571–80
99 Luster AD. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Eng J Med 1998;338:436-45
100 Shadidi KR. New drug targets in rheumatoid arthritis: focus on chemokines. BioDrugs. 2004;18:181-7
101 Caproni M, Torchia D. Infiltrating cells, related cytokines and chemokine receptors in lesional skin of patients with dermatomyositis. Br J Dermatol 2004;151:784-91
102 Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, et al. The role of 38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. FEBS 2000;465: 23–7
103 Westra J, Limburg PC, Boer P, et al. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. Ann Rheum Dis 2004;63:1453–1459

36

TERAPIA GÉNICA

Adriana Ordoñez V.
Fernando Suárez O.

La terapia génica es una estrategia novedosa en el tratamiento de diversas patologías y surge de los conocimientos de la biología molecular aplicados al entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades humanas. En el presente capítulo se resumen los aspectos conceptuales de la terapia génica, así como las ventajas y desventajas de cada una de las aproximaciones utilizadas actualmente, incluyendo los principales vectores utilizados, y la metodología in vivo *vs.* ex vivo *de trasfección de genes. También se discuten sus aplicaciones en algunas patologías autoinmunes y los aspectos éticos que se derivan de esta novedosa tecnología en el manejo de pacientes con enfermedades crónicas.*

Contenido

Generalidades
Estrategias utilizadas
Protocolos de investigación
Éxitos y fracasos
Terapia génica en enfermedades autoinmunes
Aspectos éticos

Introducción

La terapia génica ha recibido gran atención por parte de la comunidad médica y científica, al considerarla una importante estrategia terapéutica encaminada al manejo de enfermedades en las cuales no hay tratamiento o en las que éste ha sido poco satisfactorio (1). Sus potenciales aplicaciones comprenden el manejo de un amplio espectro de patologías, desde la enfermedad coronaria hasta el cáncer, planteando un ambicioso objetivo que comprende la reparación de genes y la modulación de su expresión (2).

Las enfermedades autoinmunes son patologías multifactoriales y poligénicas de etiología desconocida, que comprenden aproximadamente el 5% de las enfermedades prevalentes en occidente (3-5). Este grupo de enfermedades cumple con las características esenciales para ser incluidas en propuestas terapéuticas como la generada por la terapia génica, porque son un grupo de enfermedades crónicas e incurables de alto impacto, tanto en la calidad de vida del individuo, como en el alto costo económico que acarrean (6). La mayoría de las terapias disponibles actualmente sólo detienen temporalmente el proceso patológico sin reparar el daño tisular causado por el sistema inmune. La terapia génica se encamina principalmente a la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria anómala y debe asociarse con otras terapias, como por ejemplo la terapia de células madres (células troncales o "stem cells") para reparar el tejido afectado (7), o la terapia con alo/xenotrasplantes que reemplacen el tejido perdido (8), trasplantes que a través de la terapia génica sobrevivan y no sean rechazados por el receptor (9).

Generalidades

Desde la confirmación, en los años cincuenta, de la configuración bioquímica del DNA (10) y su contenido genético, los investigadores han buscado los mecanismos moleculares que producen enfermedad. Después de cinco décadas de investigaciones se tienen elementos, conocimientos e instrumentos que han permitido el desarrollo de la terapia génica, la cual consiste en el reemplazo de un gen defectuoso por un gen funcional, tomando DNA, DNA genómico o el DNAc (DNA copia) que codifique para la proteína específicamente involucrada en el proceso patológico, para restablecer la función normal de ésta (11). El éxito de la terapia se mide por las funciones agregadas o modificadas en la célula.

Inicialmente, la terapia génica se diseñó para tratar enfermedades mendelianas o producidas por un único gen (monogénicas). Posteriormente, se aplicó a enfermedades más complejas como se expondrá más adelante. Los mayores problemas prácticos de la terapia génica se encuentran en el momento y lugar de la "entrega" del material genético de reemplazo o reparador, es decir en el momento de la transfección, que es el proceso por el que un gen o un fragmento de DNA foráneo es transferido o introducido en una célula; y en la cantidad de proteína producida por el gen transfectado, lo cual está directamente relacionado con la duración del efecto deseado (12).

La importancia de la terapia génica fue evidente desde sus primeros ensayos en 1989, cuando se inició su aplicación en pacientes afectados por la deficiencia de la enzima ADA (adenosin deaminasa) (13), un desorden autosómico recesivo perjudicial al sistema inmune, conocido como Inmunodeficiencia Severa Combinada. En esta enfermedad, la ausencia de ADA tiene como resultado la muerte prematura de linfocitos T, la cual genera una inmunodeficiencia clínicamente severa y mortal. En el ensayo inicial, los investigadores transfirieron un gen normal de ADA en linfocitos de niños nacidos con el desorden y, posteriormente, el gen se trasfectó a células de médula ósea. En ambas estrategias, la manipulación se realizó *ex vivo*: las células se aislaron de un paciente, se expusieron a un retrovirus que tenía el gen terapéutico, y se reintrodujeron al paciente. Estos esfuerzos proporcionaron una evidencia clara de la viabilidad y seguridad del proceso; consiguiendo la trasfección del gen, el cual mantuvo su trascripción activa y adicionalmente, se demostró que no era tóxico. Aunque los beneficios clínicos a largo plazo aun no han sido probados, estos esfuerzos tempranos sirvieron para establecer la viabilidad potencial de la "entrega" del gen como una estrategia terapéutica.

Pronto se realizaron otros esfuerzos *ex vivo*. Varios grupos se concentraron en enfermedades neoplásicas (14) y en la hipercolesterolemia familiar (15), ésta última descrita como un desorden mendeliano en el que los pacientes carecen del receptor hepático para las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En ausencia del receptor, los pacientes manifiestan una hiperlipidemia extrema, presentando clínicamente manifestaciones de enfermedad ateroesclerótica y coronaria a edades tempranas. En el planteamiento terapéutico molecular de esta patología, el paciente era sometido a resección quirúrgica de un pequeño segmento hepático. Posteriormente, cada hepatocito se procesó y se expuso a un retrovirus modificado, transportador del gen humano del receptor de la LDL, con el fin de trasfectar el gen. Estas células modificadas se llevaron nuevamente al hígado a través de la vena porta del paciente, demostrando la viabilidad y la seguridad del proceso, aunque la duración y el nivel de la expresión del gen fueron bastante bajos. El ensayo inicial no mostró beneficio terapéutico, pero si información importante para las posteriores transferencias al hígado.

Es importante anotar que al hablar de terapia génica no se piensa solamente en el gen, sino que se incluye la proteína. Por ejemplo, para la deficiencia de ADA, se intenta corregir la deficiencia enzimática con una proteína funcional (16). De igual modo, para la hipercolesterolemia familiar se corrige el defecto con un receptor que mantenga su actividad fisiológica (17). De esta manera se busca que la proteína sea "entregada", y no solamente el gen.

La terapia génica busca tratar las enfermedades, pero se diferencia de la terapia biológica y de la terapia celular, básicamente en el procedimiento. La inmunoterapia, también llamada terapia biológica, terapia modificadora de la respuesta biológica o bioterapia, utiliza el sistema inmu-

Tabla 1. Células blanco de la terapia génica.

Células Somáticas	Células Germinales
Terapia en la que se remueven algunas células del paciente con el daño genético, se convierten en transgénicas introduciéndoles la información genética de interés. Y luego son reintroducidas en el organismo del paciente. Se espera que las células sigan funcionando normalmente pero es claro que al ser somáticas no pasan a la descendencia del individuo.	Es una terapia más ambiciosa, consiste en introducir células transgénicas dentro de las células germinales, logrando que algunos gametos lleven el genotipo corregido. Estos resultados han sido informativos en modelos animales, y si bien el protocolo no es aplicable a humanos consiste en remover del animal (que tiene un defecto genotípico) células de un embrión temprano (blastocisto), modificarlas y regresarlas. Estas células vienen a hacer parte después de varios tejidos del cuerpo incluyendo los germinales y van a pasar el gen a su progenie.

nológico del cuerpo directa o indirectamente para combatir la enfermedad o para disminuir los efectos secundarios de algunos tratamientos contra la misma, en particular el cáncer (18). La terapia celular no utiliza un sistema específico o vía molecular intracelular, sino que utiliza la célula completa; se basa en la obtención (aislamiento) de las células, la producción de un implante celular (manipulación *ex vivo*), y una implantación de éstas al paciente. De esta técnica se conocen muy buenos resultados, principalmente en regeneración hepática, miocárdica, ósea, de cartílago, de tejidos blandos y de piel, entre otros (19). La terapia génica clásica se basa en la entrega de genes o segmentos de genes a células blanco específicas, utilizando diferentes métodos y vías, con el objeto de obtener la expresión óptima del gen introducido (sea que se mejore la producción de la molécula faltante, que se eliminen las células enfermas directamente, o que se activen células del sistema inmune para que mate a las células enfermas). La terapia génica no clásica consiste en lograr la inhibición de la expresión de genes asociados a la enfermedad, y se encamina también a la corrección del defecto genético y a restaurar la expresión normal del gen (20).

A continuación se enumeran las principales estrategias utilizadas en la terapia génica, las células en que es posible realizarla, la metodología utilizada y los principales vectores usados en los protocolos actuales.

Estrategias utilizadas en terapia génica

1. Inserción génica: introducción de una copia de un gen normal en las células tratadas.
2. Corrección dirigida de mutaciones (gene targeting).
3. Supresión o eliminación dirigida de células específicas: insertando genes suicidas o genes estimuladores de la respuesta inmune.
4. Inhibición dirigida de la expresión génica: bloqueando la trascripción del DNA, la traducción del RNA o la función proteica.

Las células en donde se pueden realizar, al menos técnicamente, la trasfección de genes y que son blancos de la terapia génica se resumen en la Tabla 1. La trasfección y, finalmente, la trasformación de las células blanco, se puede alcanzar a través de los métodos descritos: *ex vivo* e *in vivo* (21), los cuales son resumidos en la Tabla 2. Aunque se han estudiado aplicaciones para la terapia *ex vivo* de genes, la tendencia más reciente ha sido la de buscar aplicaciones para la terapia *in vivo*. La ventaja de ésta última es que no demanda una infraestructura muy elaborada, ni las técnicas especiales que se requieren para extraer, manipular y reimplantar células del paciente porque el gen terapéutico se administra directamente al paciente, como cualquier otro medicamento.

Los vectores son los mensajeros que trasportan la información de interés a la célula blanco. En una empresa de mensajería éstos serian los mensajeros que transportan "paquetes" cerrados, protegidos, conociendo sólo la dirección en donde los recogen y la dirección en donde los entregan; deben cumplir con la protección y envoltura del paquete, así como contar con elementos propios para poder cumplir su labor tales como medio de transporte, casco, etc. Esta analogía es mostrada en la Figura 1.

Tabla 2. Aproximaciones técnicas utilizadas para la trasfección de genes.

Ex vivo (fuera del cuerpo)	*In vivo* (dentro del cuerpo)
Cuando los genes se transfieren a células en cultivo extraídas del paciente, que posteriormente son reincorporadas al organismo. El gen bien sea terapéutico o no, se transfiere directamente al paciente. Por ejemplo, a través del torrente circulatorio. Una variante de ésta última es la modalidad de terapia *in situ*, si el tratamiento es realizado por inyección directamente en el órgano afectado.	El gen bien sea terapéutico o no, se transfiere directamente al paciente, por ejemplo, a través del torrente circulatorio. Una variante de esta última es la modalidad de terapia *in situ*, si el tratamiento es realizado por inyección directamente en el órgano afectado.
Ejemplos: La transformación de linfocitos T para el tratamiento en la deficiencia en adenosina deaminasa, (ADA), de hepatocitos para la hipercolesterolemia familiar, y de linfocitos infiltradores de tumores (TIL) para enfermedades neoplásicas. Protocolos realizados con liposomas directamente por vía nasal para el tratamiento de enfermedades como Fibrosis quística.	Ejemplos: Protocolos realizados con liposomas directamente por vía nasal para el tratamiento de enfermedades como Fibrosis quística.

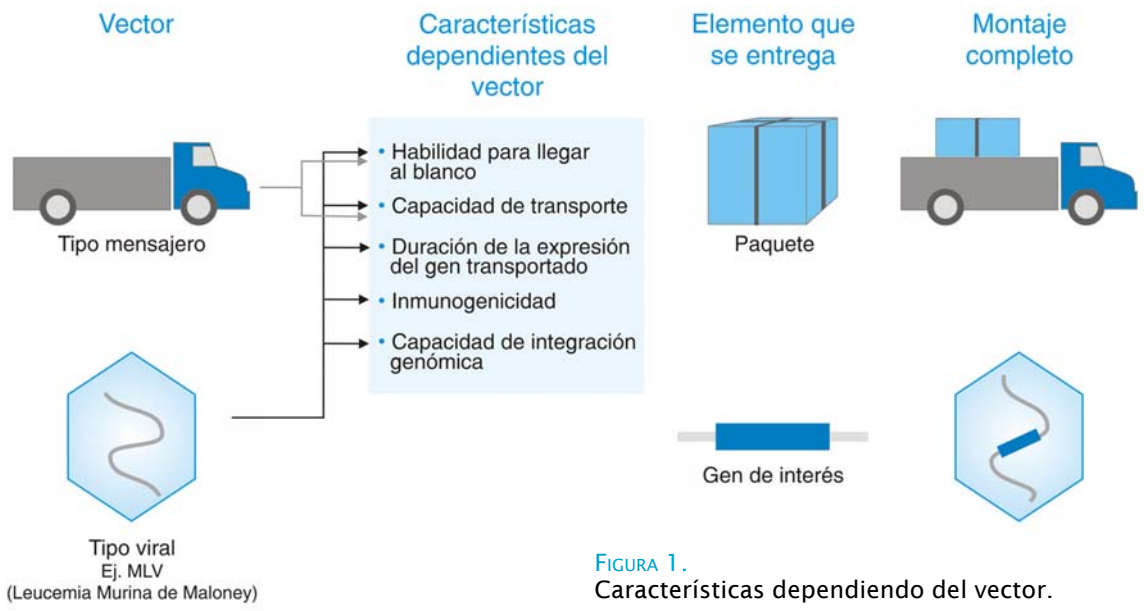


FIGURA 1.
Características dependiendo del vector.

El vector (sea cual sea) debe cumplir con la entrega del "paquete", es decir el gen de interés, debe contar con un camino y una vía que lo lleven a su célula de destino (vía respiratoria, inyección directa, etc.) y debe contar con elementos propios como los lípidos en el liposoma, o en el caso de los virus, los genes que codifican para proteínas de cubierta (gag), para DNA polimerasa (pol), para glicoproteínas de superficie (env) (Figura 2).

Los vectores se clasifican, de manera general, en vectores virales y no virales, éstos últimos al ser virus modificados, como se verá más adelante, no están exentos de riesgo debido a que pueden ser patogénicos. Aun así el gen "nuevo" o gen de interés, se introduce por ingeniería genética dentro de un virus modificado (en el que su ciclo celular involucra la penetración de la membrana celular, seguida de la inserción del DNA o el RNA), para aprovechar su capacidad de infectar. Entre las ventajas del uso de éstos vectores se encuentran la diferencia en capacidades de carga y las diferentes vías de entrada a la célula. Su alta especificidad involucra receptores que facilitan la entrada de la información a las células. Poseen también la habilidad de evadir la degradación intracelular e inducir en la célula hospedera la expresión de los genes virales. Entre los más utilizados están los Adenovirus, Retrovirus, Herpesvirus y virus asociados a Adenovirus. Sus principales características se resumen en la Tabla 3.

En los vectores no virales, el gen es entregado artificialmente (ver Tabla 4 y 5). En algunos casos se trata de mensajeros encapsulados en una capa lipídica, que facilita el paso a través de la membrana celular. En otros casos, se trata de partículas cubiertas con una capa delgada de oro, para que puedan ser disparadas (DNA Gun) y pasen a través de la piel. Los vectores no virales se deben unir a proteínas con capacidad de unión a receptores expresados en la superficie de algunos tipos de células. En la práctica clínica son más económicos y más fáciles de producir, aunque son menos efectivos que los virales (29).

Existen otros sistemas utilizados en terapia génica, los cuales han sido desarrollados para liberar y expresar genes exógenos *in vitro* e *in vivo*, entre éstos se tienen:

1. Los sistemas químicos (precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextran, polybreno, liposomas neutros, aniónicos, catiónicos y conjugados de polilisina).
2. Los sistemas físicos (microinyección, electroporación, biobalística).
3. Los sistemas biológicos (vectores virales).

Esta clasificación no hace énfasis en la diferencia entre uso de vectores virales y no virales sino en el sistema utilizado de manera general (29).

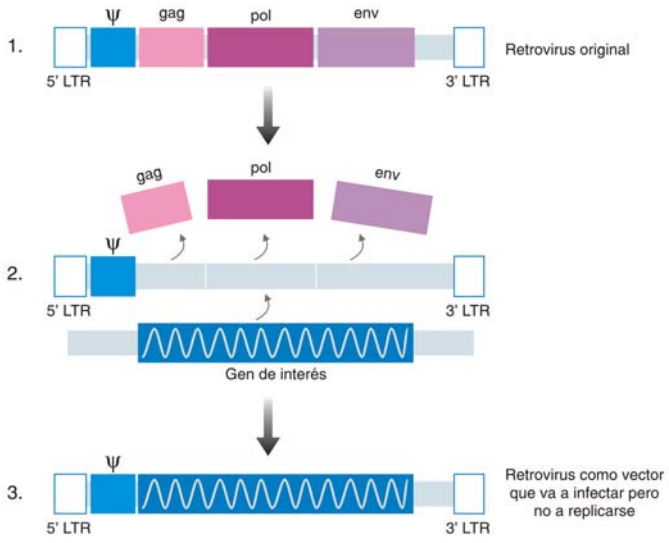


FIGURA 2.
Modelo de vector retroviral, MLV (Leucemia Murina de Maloney).
LTR: secuencias repetidas terminales largas; ψ psi: genes que codifican para encapsulación; gag: proteína de cubierta; pol: DNA pol; env: glicoproteínas de superficie, controlan transcripción e integración en el genoma del hospedero.

Protocolos de investigación

Hasta los primeros meses del año 2004 se habían implementado 918 protocolos de terapia génica en 24 países (23). La gran mayoría de éstos buscan la mejoría de enfermedades como el cáncer (66%), enfermedades monogénicas (9.8%), enfermedades cardiovasculares (8.3%) y patologías infecciosas (6.5%). Los vectores más utilizados han sido los Retrovirus (28%) y los Adenovirus (26%), seguidos por dos vectores no virales, el DNA desnudo (14%) y los liposomas (9.3%).

TABLA 3. Principales características de vectores virales.

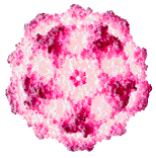
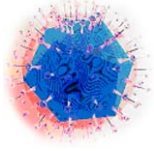
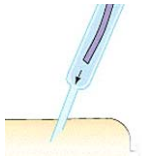
Virus	Características	Forma
Adenovirus Familia de virus con doble cadena de DNA	Serotipos más usados: Ad2 y Ad5 Células Blanco: Células de pulmón y del tracto respiratorio. Ventajas: Transforman células tanto en división como en no división. Tienen preferencia por células blanco de los pulmones. Capacidad de 7 a 35kb. No hay integración en el DNA cromosómico. Fáciles en rutas como: inyecciones intraarticulares, periarticulares o inyecciones directas a glandulas salivales y ojo. (22) Desventajas: Estabilidad a corto plazo, tienen limitaciones desde el punto de vista inmunológico, por lo que es necesario hacer aplicaciones repetidas lo cual ha generado respuestas inmunes e inactivación del vector. Son altamente inmunogénicos en el hombre en donde el 50% tiene Anticuerpos contra ellos (22). Para disminuir esta inmunogenicidad y aumentar la capacidad de transporte se está desarrollando el "gutless", que es un adenovirus al que le han removido todas sus secuencias codificadoras (23).	
Retrovirus Virus RNA monocatenario Usan transcriptasa inversa para convertir el RNA en DNA	Son los más utilizados. En estos vectores la mayor parte de las regiones codificadoras para las proteínas estructurales gag, pol y env son reemplazadas por el gen o genes de interés. Lo que disminuye el riesgo latente de activación viral. Ofrece alta eficiencia y efectividad. Hasta el momento no se han reportado efectos secundarios. Ventajas: Infectan y no se replican, no transportan mas de 8 kb. Logran integración con el DNA cromosómico y presentan estabilidad a largo plazo debido seguramente al hecho de que esta integración, permite una expresión del gen insertado a más largo plazo. Desventajas: Sólo hay integración en células en división. Los genes se integran aleatoriamente y esto podría representar un riesgo si ocurriera inactivación de un gen supresor de tumores o bien activación de un oncogén.	
Virus Adenoasociados Parvovirus con DNA de cadena simple no envuelto.	Serotipo más usado: AAV2 Capacidad: menos de 4 kb Sólo se integra en el cromosoma de la célula, por lo que es necesaria una coinfección con Adenovirus que son los que permiten la replicación y la síntesis de la proteína. Se ha preparado un adenoasociado recombinante (rAAV) dejandole solamente las repeticiones terminales requeridas para el empaquetamiento, integración y replicación del virus. (24) Estos virus han sido utilizados en modelos autoimmunes experimentales de artritis y diabetes. Ventajas: Su vía de infección es el tracto respiratorio. Desventajas: Bajos títulos. El serotipo comúnmente utilizado presenta seropositividad de anticuerpos del 96%) (23)	
Virus Herpes Simple Virus DNA neurotrópico	Modelos animales efectivos en diabetes son ratones y primates. (25) Ventajas: Tropismo por sistema nervioso central, por el tamaño del gen que pueden cargar. Desventajas: Expresión limitada a pocos días. Además es un sistema que apenas está en desarrollo; hasta el momento sólo permiten la expresión transitoria del gen de interés y su eficiencia de transducción es baja.	
Lentivirus	Son retrovirus complejos, caracterizados por un desarrollo genético mayor. Ademas de gag, pol y env, contienen los genes *rev,tat,vif,vpr, upu,nef* y otros genes accesorios (25) Ventajas: Se integra al cromosoma de la célula huésped, baja inmunogenicidad. Su bioseguridad se aumentó al introducirle información de inactivación propia.Se reportan varios modelos exitosos, en leucemia (26), en células hematopoyéticas (27,28) Desventaja: Eficiencia en infección	

Tabla 4. Principales características de vectores no virales.

Vector	Características	Forma
Liposomas "vesículas" microscópicas compuestas de lecitina. Son capaces de transportar material delicado soluble en agua dentro del tejido.	No portan genes víricos por lo que no producen enfermedades Desventajas: Eficacia y estabilidad disminuidas	
DNA desnudo Es la forma más básica de DNA. No es inmunogénico, no tiene la habilidad para entrar solo en la célula, se localiza en el núcleo y se incorpora en el genoma.	Inyecciones de DNA mediante microagujas y microscopio de micromanipulación. El DNA es rápidamente hidrolizado y degradado por nucleasas séricas. No es inmunogénico, Producción simple, depende básicamente del método físico de entrada.(Tabla 5). Presentan poca estabilidad,y sólo pueden introducirse en cantidades pequeñas.	

En 1990 fue aprobado el primer protocolo en humanos para la Inmunodeficiencia Severa Combinada. Cada año en promedio se han aprobado 52.6 protocolos de terapia génica, siendo el año de 1999 el de mayor número de protocolos aprobados (total: 113). Entre los países más interesados en la investigación se encuentran Estados Unidos (67%), Reino Unido (11%), Alemania (6%), y Suiza, Francia, Bélgica, Canadá, Italia, Japón y otros con menos del 5%. Los tipos de genes transfectados son más de cien, siendo los genes de citoquinas los más utilizados (26%), seguidos de los genes que codifican para antígenos modificadores de células blanco (14%), supresores de tumores (12%) y genes suicidas (8.1%) entre otros (30).

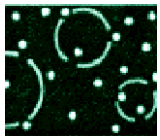
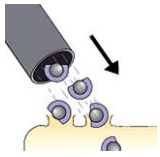
Éxitos y fracasos

Se puede considerar la terapia génica en la Inmunodeficiencia Severa Combinada, ligada al cromosoma X, como un éxito inicial, ya que la información genética fue introducida por medio de retrovirus desde la medula ósea a las células madre. Después de dos años, en ocho de los diez niños tratados, se restauró la población de linfocitos T y su respuesta inmunológica fue normal. Sin embargo, este protocolo también se debe considerar con precaución, porque en él se presentó leucemia post terapia génica dos años más tarde, debido a la activación del oncogén LMO2 (31), uno de los efectos adversos más graves en la historia de la terapia génica.

Es de anotar que en los trabajos con vectores virales tipo virus adenoasociados, considerados como entre los más seguros al no causar enfermedad en humanos (32), se encuentran reportes de que podrían causar efectos celulares similares a los acontecidos en el cáncer (33). Otros vectores que han presentado dificultades similares son los Adenovirus , a los que se les atribuye la muerte de un hombre joven tratado por una deficiencia de Ornitina Transcarbamilasa (34, 35). Sobre éstos deben anotarse también sus éxitos, en modelos animales con diabetes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, miocarditis autoinmune y uveitis autoinmune (24).

Después del caso Gelsinger y de los de leucemia, ambos acompañados de desinformación y escepticismo de los investigadores, varios laboratorios cerraron sus líneas (36). Pero la mayoría han permanecido, argumentando que es necesario desarrollar vectores nuevos y seguros que no intervengan en la activación de oncogenes. Varios investigadores sugieren que la terapia génica, como cualquier otro tratamiento, tiene efectos colaterales que deben ser manejados de igual modo que en las terapias convencionales y que, incluso, con el riesgo comprobado de desarrollar leucemia, la terapia génica sigue siendo hasta hoy la mejor terapia para el síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada (37). El Instituto de salud de los Estados Unidos publicó nuevas recomendaciones para el uso

Tabla 5. Métodos de entrada para vectores no virales.

Método	Descripción	Forma
Electroporación	Un pulso eléctrico abreviado causa que se formen poros temporales en la membrana por entre los cuales puede entrar el DNA. Poca estabilidad, cantidades muy pequeñas	
Bombardeo con partículas de oro	«Arma de ADN»: partículas metálicas minúsculas que contienen la información se disparan en una colonia de células	

de estos vectores en terapia génica las cuales se siguen en la actualidad (38).

Terapia génica en enfermedades autoinmunes

Antes de que las enfermedades autoinmunes en humanos puedan ser tratadas con terapia génica, la seguridad y eficacia de los vectores y trasgenes utilizados debe ser probada en modelos animales experimentales (39). El siguiente resumen de los principales aspectos de la terapia génica en las enfermedades autoinmunes hace referencia únicamente a modelos animales, principalmente murinos.

Artritis reumatoide

Existen diferentes aproximaciones desde la terapia génica que pueden ser utilizadas para el manejo de la artritis. Los genes de interés pueden ser dirigidos localmente al sitio de la enfermedad a través de inyección intraarticular, utilizando vectores virales y liposomas, usando aproximaciones tanto *in vivo* como *ex vivo* (40). Alternativamente, los genes pueden ser enviados al sitio de la inflamación usando células T circulantes o células presentadoras de antígenos modificadas. Unos de los objetivos de la terapia génica en la artritis reumatoide es la respuesta inmune que media la destrucción articular, manejando la actividad de citoquinas y la formación del pannus. La modulación de la respuesta inmune se ha logrado inhibiendo la interacción entre las moléculas de la familia B7 de las células presentadoras de antígeno y el CD28 en la superficie de los linfocitos T, utilizando CTLA-4 soluble. La interacción entre la molécula CD40L de la familia del TNF expresada en las células T CD4 y la CD40 de las células presentadoras de antígenos es importante en la iniciación de la respuesta inmune. Esta interacción puede ser bloqueada con CD4-Ig, y ha sido probada utilizando vectores adenovirales que expresan esta molécula en ratones con artritis inducida por colágeno. Al ser la artritis reumatoide una enfermedad de respuesta principalmente Th1, la inyección articular de citoquínas como IL-4, IL-10 e IL-13 ha demostrado actividad antiartrítica en diversos modelos. Se ha generado una considerable atención a los inhibidores de TNF e IL-1, lo cual se ha ensayado a través de la administración intraarticular de DNAc de receptores solubles de TNF tipo I y II así como del receptor de la IL-1. Otras aproximaciones comprenden el uso de genes pro-apoptóticos, genes suicidas y genes antiangiogénicos que interfieren en los procesos de adhesión, quimiotaxis y angiogénesis. Una vez instaurado el proceso inflamatorio y las manifestaciones clínicas son evidentes, se puede modificar el proceso con agentes biológicos como el TGF-β y la reparación de tejidos con células madres (41-43). Reuniendo las principales características y desarrollos en vectores no inmunogénicos regulados trascripcionalmente, junto a los avances en células madre o células troncales, es posible incrementar el éxito de estos modelos (Figura 3). El objetivo es que la terapia génica brinde un beneficio a largo plazo a los afectados (43).

Diabetes Mellitus tipo I

Teniendo en cuenta la insulinitis generada por el sistema inmune en individuos genéticamente predispuestos a la enfermedad (Figura 4), se han planteado diversas aproximaciones para el manejo de la diabetes que incluyen la terapia génica y la terapia celular, con el fin de alcanzar la supervivencia de islotes de Langerhans recientemente afectados por el proceso inflamatorio, o de islo-

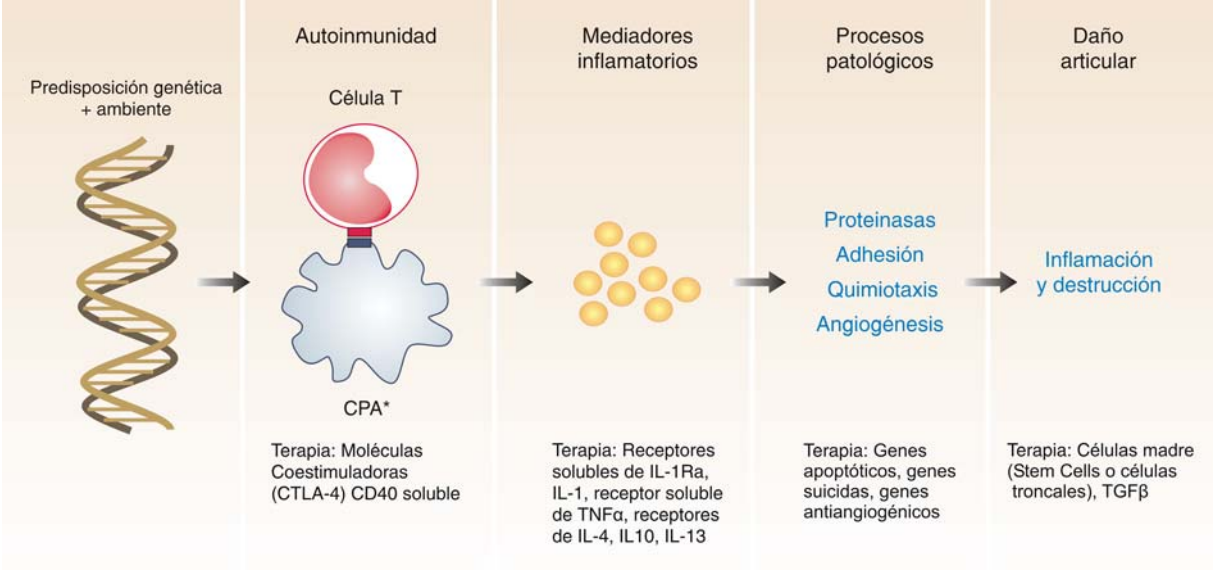


FIGURA 3.
Patogénesis de la artritis reumatoide.
La patogénesis de la artritis inicia con la interacción entre el ambiente y la predisposición genética individual. Para cada paso del desarrollo fisopatológico de la enfermedad es posible enviar agentes biológicos que modifiquen o intefieran con el proceso. * CPA: célula presentadora de antígenos.
Modificado de ref. 42.

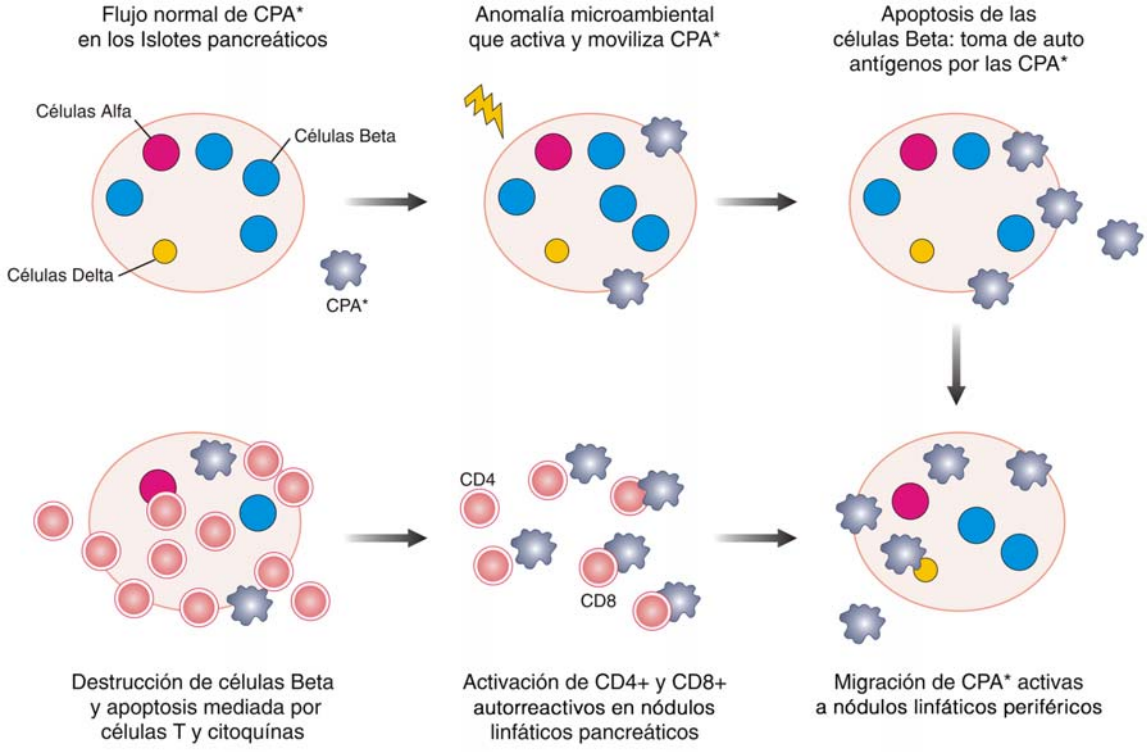


FIGURA 4.
Insulinitis.
Proceso de la insulinitis que lleva a la destrucción de las células Beta.
Modificado de ref. 45.

TABLA 6. Estrategias terapéuticas utilizadas en el manejo molecular de la diabetes tipo I.

Estrategia terapéutica	Células blanco	Estrategia de trasformación celular
Transferencia de precursores tímicos autólogos.	Células precursoras tímicas de células presentadoras de antígenos.	Vectores virales o no virales, con genes que codifican autoantígenos y/o genes inmunorreguladores.
Transferencia de células precursoras de células β o trasformación de células de los islotes de Langerhans.	Progenitores de células β. Células de los islotes de Langerhans. Células troncales de médula ósea progenitoras de células presentadoras de antígenos.	Vectores virales o no virales con genes inmunoreguladores. Vectores virales o no virales con compuestos químicos que protegen o preservan las células β. Vectores virales o no virales con genes que codifican factores que inducen el fenotipo de células β.
Transferencia autóloga de células de medula ósea o transferencia de células presentadoras de antígenos trasformadas.		Vectores virales o no virales con genes inmunorreguladores.

TABLA 7. Genes que promueven la supervivencia de células β.

Genes Antiapoptóticos	Citoquinas	Genes inmunoreguladores
Bcl-2	IL-4	Indoleamina 2-3 dioxigenasa
BCl-X_L	Proteína antagonista del receptor de IL-1	CTLA-4Ig
Heme-oxigenasa 1	IL-12p40	Fas Ligando
Proteína Kinasa C delta dominante negativa	IL-10 Viral	Genes adenovirales E3
MyD88 dominante negativa	TGF-β	
IGF-I	IL-10	
IκBα super supresor		
Hsp70		
A20		
PEA-15		
Catalasa 242,243		
Superóxido dismutasa de manganeso		

tes alo o xenotrasplantados. Estas estrategias pueden ser utilizadas individualmente o en combinación. La primera táctica consiste en la transferencia de genes que codifican moléculas inmunorreguladoras a las células autólogas trasplantadas que puedan manejar la respuesta inmune a través de las células dendríticas (45). Otra estrategia consiste en la transferencia de genes citoprotectores a los islotes alo o xenotrasplantados. Una tercera vía de manejo es la trasfección de genes inmunorreguladores y/o autoantígenos a células presentadoras de antígenos autólogas o a sus células precursoras en la medula ósea, que al ser modificadas por el gen transfectado, regulan la respuesta inmune. También se ha experimentado la transferencia de genes que promuevan el fenotipo de células β en células β-progenitoras, para que mantengan un grupo de células funcionales en los islotes. Por último, se ha planteado la transferencia directa de vectores con moléculas inmunoreguladoras a individuos susceptibles o con inicio reciente de la patología, es decir antes de la destrucción tisular total. En la Tabla 6 se resumen las estrategias terapéuticas utilizadas en el manejo molecular de la diabetes tipo I y en la Tabla 7 se resumen los mecanismos que promueven la supervivencia de alo o xenotransplantes *in vitro* e *in vivo* de células β (46). La terapia celular incluirá células progenitoras como reemplazo de las células β aunque la biología de éstas está siendo apenas conocida. Su importancia terapéutica rádica en que su uso, combinado con la inducción paralela de tolerancia inmunológica, conlleva a la supervivencia del alo o xenotrasplante (Figura 5).

Enfermedad celíaca

La enfermedad inflamatoria intestinal, específicamente la enfermedad celíaca, es el prototipo de enfermedad mediada por la inmunidad, que ante un reto ambiental generado por la presencia de la gliadina o gluten, proteína que no puede ser degradada completamente, genera una respuesta inflamatoria severa, ante la presencia de trasglutaminasa tisular, después de la deaminación de la glutamina a ácido glutámico, con la condición de una activación preliminar de la respuesta inmune no adaptativa del intestino delgado.

Las estrategias propuestas para su manejo incluyen el envío de citoquinas inhibidoras al sitio de la lesión tisular, utilizando células que no migren, como los fibroblastos, pero que puedan ser inyectadas en el lugar en donde se necesite la liberación del inhibidor. También se ha experimentado el uso de linfocitos, que aunque migran pueden expresar antígenos específicos del tejido intestinal. Tal ha sido el caso de células T específicas del colágeno tipo II y proteína específica de mielina utilizadas respectivamente en modelos de artritis y de esclerosis múltiple (46). El máximo beneficio se lograría con el uso de células T específicas de la Gliadina que trasportaran genes inmunorreguladores. Los principales genes inmunorreguladores que trasfectarían las células móviles (linfocitos) o inmóviles (fibroblastos) utilizando vectores específicos de la gliadina se resumen en la Tabla 8. La enfermedad celíaca es el prototipo de enfermedad en donde hay un claro rol de células T específicas de antígeno y en donde se ha demostrado que su inhibición resulta en disminución de la patología. La aproximación terapéutica actual es la remoción completa del Gluten de la dieta, lo cual es efectivo; sin embargo, no es siempre fácil seguir las recomendaciones dietéticas y, por lo tanto, otras opciones terapéuticas deben ser consideradas. El uso de la terapia génica es una hipótesis remota, debido a que se trata de una patología, en general benigna y tratable.

Tabla 8. Genes e Inmunoglobulinas de interés en el manejo molecular de la enfermedad celíaca.

IL-10
Anti IL-15
IgA Anti gliadina
IgA Anti tTG

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad inflamatoria crónica con complejas manifestaciones clínicas. En su fisiopatología se han identificado factores importantes que incluyen anomalías endocrinológicas y metabólicas (47). En su fisiopatología también intervienen factores ambientales que desencadenan o exacerban la enfermedad, como químicos o infecciones virales. Existe, igualmente, una predisposición genética que refleja una alta heterogeneidad tanto alélica como génica. Este complejo genera varias anormalidades inmunológicas como la disfunción de células T, en particular reguladoras, y células asesinas naturales (NK), un alto nivel de anticuerpos circulantes, deficiencia del complemento, reducción de citoquinas y remoción anormal de complejos inmunes. La terapia génica plantea que el manejo de de esta enfermedad se debe realizar a través de la expresión de genes inmunomoduladores y mediadores antiinflamatorios, los cuales pueden ser enviados a los tejidos de interés con vectores virales y plásmidos. La Tabla 9 resume los genes planteados para la implementación de estos procesos (48).

Tabla 9. Genes de interés utilizados en el manejo de modelos de lupus eritematoso sistémico.

Terapia génica para el tratamiento del Lupus	
Citoquinas antinflamatorias	TGF-β1
Bloqueadores de la coestimulación celular	CTLA-4Ig
Inhibidores de citoquinas	IFN-γR IgG1-Fc

Enfermedades desmielinizantes

Los pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad mediada por la inmunidad que causa desmielinización y progresiva neurodegeneración, podrían beneficiarse de estrategias antiinflamatorias como neuroprotectoras. Sin embargo, en esta patología el reto de la terapia génica es mayor que en otras debido a que las células de los tejidos afectados no son mitóticamente activas, lo que limita la

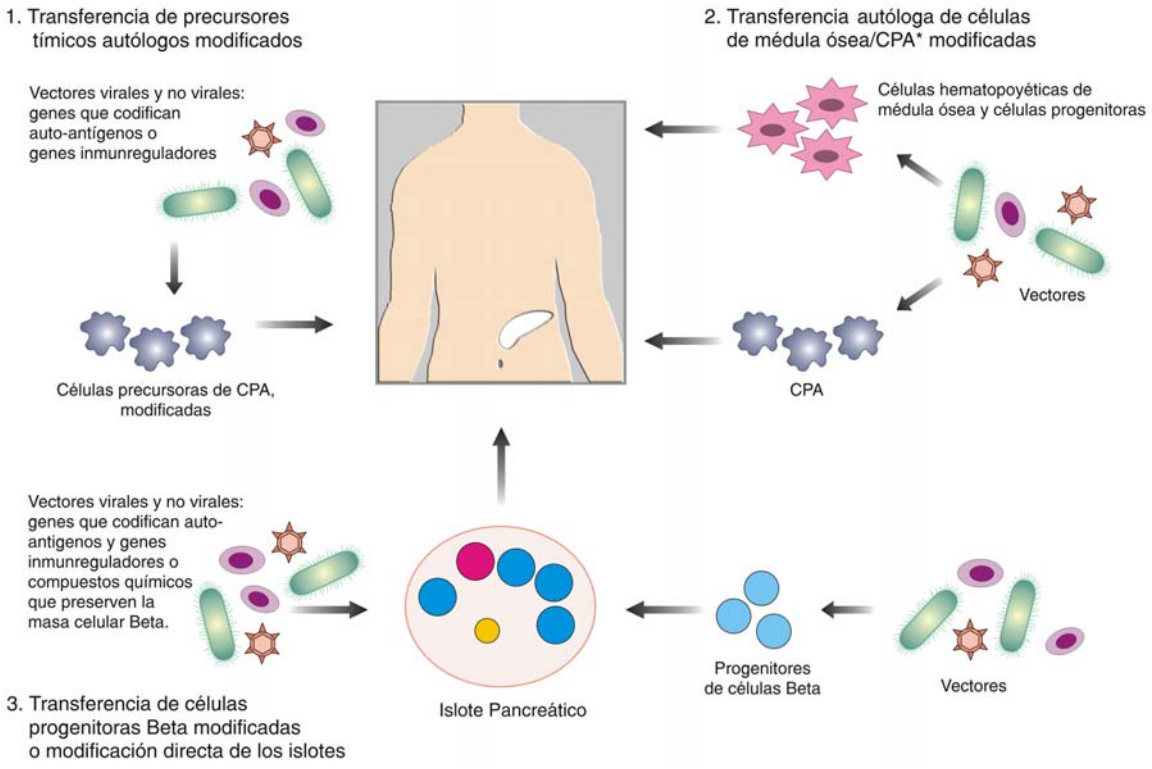

1. Transferencia de precursores tímicos autólogos modificados
2. Transferencia autóloga de células de médula ósea/CPA* modificadas
Vectores virales y no virales: genes que codifican auto-antígenos o genes inmunreguladores
Células hematopoyéticas de médula ósea y células progenitoras
Vectores
Células precursoras de CPA, modificadas
CPA
Vectores virales y no virales: genes que codifican auto-antigenos y genes inmunreguladores o compuestos químicos que preserven la masa celular Beta.
Progenitores de células Beta
Vectores
3. Transferencia de células progenitoras Beta modificadas o modificación directa de los islotes
Islote Pancreático

FIGURA 5.
Estrategias de terapia génica en la diabetes.
1. Transferencia de genes de moléculas inmunorreguladoras a células autólogas como las células presentadoras de antígenos (CPA) 2. Transferencia de células hematopoyéticas y progenitoras de CPAs modificadas que regulen y protejan a las células β. 3. Transformación de células progenitoras de células β para evitar la autoinmunogenicidad o el uso directo de vectores virales en los islotes para regular la inflamación en pacientes con inicio reciente de la insulinitis a través de genes reguladores u otros compuestos químicos.
Modificado de ref. 45.

naturaleza de los vectores a utilizar. Otro inconveniente es el proceso inflamatorio localizado a ciertas áreas del sistema nervioso, que hace inviable la administración continua del vector o el plásmido a través de inyecciones repetidas. Por lo tanto se ha planteado el envío de los vectores transportadores a través del líquido cefalorraquídeo, terapia inmunogénica sistémica y vacunas de DNA. En la Tabla 10 se resumen algunos de los principales genes utilizados en el manejo de autoinmunidad inducida en el sistema nervioso central, la ruta por la cual se distribuye el vector y su efecto terapéutico (49).

Enfermedades inflamatorias del colon

La patogénesis de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, que comprenden las dos principales formas de enfermedad inflamatoria del colon, involucra una compleja interacción entre ciertos factores ambientales, inmunológicos y genéticos. La respuesta inmune es caracterizada por una reacción principalemte Th1, resultado de un imbalance entre linfocitos T CD4 proinflamatorios o reguladores y citoquinas inflamatorias Th1, principalmente TNF, IFNγ, IL-12 e IL-18. La terapia génica se dirige a regular la expresión de estas citoquinas (50)

TABLA 10. Algunos de los genes y sus vectores utilizados en el manejo de autoinmunidad en el sistema nervioso central.

Trasgen	Ruta de distribución del vector	Vector	Efecto terapéutico
IL-1β	Intravenosa	Virus de la vacuna	Profiláctico
IL-2	Intravenosa	Virus de la vacuna	Profiláctico
IL-4-Ig	Intramuscular	DNA desnudo	Profiláctico
IL-4	Intramuscular	DNA desnudo	Profiláctico
	Intramuscular	Liposomas	Profiláctico
	Líquido cefalorraquídeo	Virus de la vacuna	Terapéutico
IL-10	Intravenoso, Intramuscular, Líquido cefalorraquídeo	DNA desnudo, virus de la vacuna adenovirus, liposomas	Terapéutico y profiláctico
IFN-β	Intramuscular	Liposomas	Profiláctico y terapéutico
IFN-γ	Intravenoso y líquido cefalorraquídeo	Virus de la vacuna y herpes virus	Profiláctico y terapéutico

Aspectos éticos de la terapia génica en enfermedades crónicas

Los ensayos clínicos en donde se ha aplicado la terapia génica han sido enfocados a condiciones que amenazan de manera inmediata la vida del paciente. Cuando se considera esta terapia para enfermedades autoinmunes, crónicas, surgen aspectos éticos no revisados con anterioridad. Considerando las enfermedades terminales, los beneficios potenciales de esta terapia sobrepasan los posibles riesgos, especialmente cuando los tratamientos convencionales han fallado. No se puede afirmar lo mismo si en los ensayos clínicos se contemplan pacientes con condiciones crónicas, no fatales. Es posible argumentar que se trata de enfermedades degenerativas que afectan la calidad de vida de los pacientes y que sus tratamientos no son exitosos, pero surge la pregunta sobre el momento apropiado en el cual los investigadores deben iniciar los ensayos de la terapia génica en estos individuos.

Los procedimientos tradicionales de consentimiento informado y comités de ética que aprueban los ensayos clínicos pueden no ser suficientemente informativos para los pacientes en el caso de la aplicación de la terapia génica, que por las características de la enfermedad que pretende tratar debe ser altamente regulada, de prolongada aplicación y segura. Esta carencia de información completa surge de la comprobación de hechos que hasta el momento se consideraban teóricos, como el de la oncogénesis insercional, pero que se comprueban en tanto que los tratamientos se prolongan. El riesgo es parte de los avances en medicina, como lo han demostrado las tecnologías de trasplantes. Si el principio de precaución hubiera sido tomado al pie de la letra, los avances médicos habrían sido pocos y distanciados. De igual forma, la terapia génica conlleva riesgos para los pacientes y los investigadores se enfrentan a la pregunta de cómo y cuándo llevar las ciencias básicas a su aplicación en la clínica y si se está seguro de haber minimizado los riesgos en enfermedades que no amenazan inminentemente la vida, como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico, de tal forma que se justifique dar el paso de aplicar la terapia génica. Como en cualquier otra investigación clínica, el mejor interés para el paciente debe prevalecer (51).

Es imperativo que los pacientes y médicos tratantes no tengan expectativas exageradas sobre esta tecnología, debido a que se ha divulgado más sobre el potencial que sobre la realidad, lo cual es sin duda negativo para la objetividad de la investigación, en particular si se tiene en cuenta el corto periodo de tiempo esperado para ver los resultados de la aplicación efectiva de la terapia génica.

Referencias

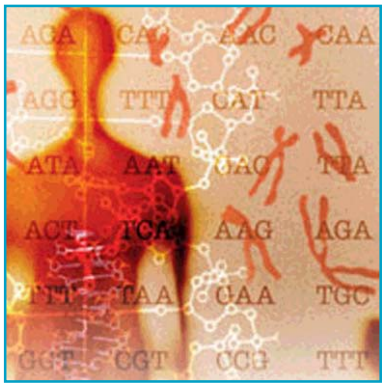
1. Said-Fernandez S, Martinez-Rodriguez HG, Said-Fernandez SL, et al. Advances and perspectives in molecular medicine. Gac Med Mex 2000;136:455-75
2. Ratilainen T, Lincoln P, Norden B. A simple model for gene targeting. Biophys J 2001;81:2876-87
3. Kvien TK. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. Pharmacoeconomics 2004;22(2 Suppl):1-12
4. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004 May;27:1047-53
5. Gibert M, Sanchez-Mazas A. Geographic patterns of functional categories of HLA-DRB1 alleles: a new approach to analyse associations between HLA-DRB1 and disease. Eur J Immunogenet 2003;30:361-74
6. Weinstock M. Chronic care: an acute problem. Hosp Health Netw 2004;78:40-2, 44-8, 2
7. Andreadis ST. Gene transfer to epidermal stem cells: implications for tissue engineering. Expert Opin Biol Ther 2004;4:783-800
8. Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, et al. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2004 Oct 16; [Epub ahead of print]
9. Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, et al. Tissue engineering of the meniscus. Biomaterials 2004;25:1523-32
10. Watson JD, Crick FH. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. Nature 2003 23;421:397-8
11. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. Postgrad Med J 2004; 80:560-70
12. Munkonge FM, Dean DA, Hillery E, et al. Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. Adv Drug Deliv Rev 2003;55:749-60
13. Blease M, Culver K, Anderson WF, et al. T Lymphocyte-Directed gene therapy for ADA- SCID. Initial trial results after 4 years. Science 1995; 270:475-80
14. Rosenberg, SA. TNF/TIL human gene therapy protocol. Hum Gene Ther 1990;1:443-62.
15. Grossman M, Raper S, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. Nat Genet 1994;6:335-41
16. Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, et al. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. Br J Haematol 2000;109:549-54
17. Dichek DA, Bratthauer GL, Beg ZH, et al. Retroviral vector-mediated in vivo expression of low-density-lipoprotein receptors in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Somat Cell Mol Genet 1991;17:287-301
18. Martin Memorial Health Systems. Glossary. http://www.mmhs.com/clinical/adult/spanish/gyneonc/glossary.htm
19. Gonzales ML. Desarrollo de Aplicaciones en Terapia Celular. Genetrix SL. España. 2003
20. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics 2. United States of America and Canada. John Wiley and Sons Inc. BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999
21. Voss SD, Kruskal JB. Gene Theraphy: A Primer for Radiologists. Imaging and Therapeutic Tecnology. Radiographics 1998;6:1343-72
22. Moskalenko M, Chen L, Roey M, et al. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. J Virol 2000:74;1761-66
23. Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, et al. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. J Virol 1997;71:1842-9
24. Monahan PE, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectors for gene theraphy: more pros than cons? Mol Med Today 2000;6:433-40
25. Gould DJ, Favorov P. Vectors for the treatment of autoimmune disease. Gene Ther 2003;10:912-27
26. Stripecke R, Cardoso AA, Pepper KA, et al. Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage- colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses. Blood 2000;96:1317-26

27. Woods NB, Muessig A, Schmidt M, et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. Blood 2003;101: 1284-9
28. Hamaguchi I, Nishiura H, Flygare J, et al. . Multipotent hematopoietic progenitors from ribosomal protein S19 (RPS19) deficient Diamond-Blackfan anemia patients exhibit a proliferation deficiency which improves upon enforced expression of RPS19. Molecular Therapy 2003;7:613-22
29. Wolff JA, Lederberg J. An early history of gene transfer and therapy. Hum Gene Ther 1994;5:469-80
30. Eldestein ML, Abedi MR, Wixon J, et al. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 an overview. J Gene Med 2004;6:597-602
31. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 2003;302:415-9
32. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat Genet 2000;24:257-61
33. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. Nature 1999;401:517-8
34. Relph K, Harrington K, Pandha H. Recent developments and current status of gene theraphy using viral vectors in the United Kingdom. BMJ 2004;329:839-42
35. Cavanzzanna-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy. Balancin the risks and benefits of clinical trials. Nature 2004;427: 779-781
36. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. Nat Rev Genet 2000;1:91-9
37. Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. Hum Gene Ther 2002;13:3-13
38. Gould DJ, Favorov P. Vectors for the treatment of autoimmune disease. Gene Ther 2003;10:912-27
39. TRNAer IH, Slavin AJ, McBride J, et al. Treatment of autoimmune disease by adoptive cellular gene therapy. Ann N Y Acad Sci 2003;998:512-9
40. Evans CH, Robbins PD. Getting genes into human synovium. J Rheumatol 1997;24:2061-3
41. Kim SH, Kim S, Evans CH, et al. Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. J Immunol 2001;166: 3499-505
42. Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. Gene Ther 2003;10:902-11
43. Woods JM, Katschke KJ, Volin MV, et al. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. J Immunol 2001; 166:1214-22
44. Whalen JD, Thomson AW, Lu L, et al. Viral IL-10 gene transfer inhibits DTH responses to soluble antigens: evidence for involvement of genetically modified dendritic cells and macrophages. Mol Ther 2001;4: 543-50
45. Bottino R, Lemarchand P, Trucco M, et al. Gene- and cell-based therapeutics for type I diabetes mellitus. Gene Ther 2003;10:875-89
46. Londei M, Quaratino S, Maiuri L. Celiac disease: a model autoimmune disease with gene therapy applications. Gene Ther 2003;10:835-43
47. Houman MH, Smiti-Khanfir M, Ben Ghorbell I, et al. Systemic lupus erythematosus in Tunisia: demographic and clinical analysis of 100 patients. Lupus. 2004;13:204-11
48. Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. Gene Ther 2003;10:861-74
49. Baker D, Hankey DJ. Gene therapy in autoimmune, demyelinating disease of the central nervous system. Gene Ther 2003;10:844-53
50. Wirtz S, Neurath MF. Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. Gene Ther 2003;10:854-60
51. Layward L, Chernajovsky Y. Targeting 'horror autotoxicus' by gene therapy: results, challenges and the future. Gene Ther 2003;10:833-4

37

EPIGENÉTICA Y TERAPIA EPIGENÉTICA

Luis Miguel Gómez
Juan-Manuel Anaya



El estudio de la epigenética involucra cambios rápidos que afectan la expresión génica como modificaciones metil, acetil, fosforil, entre otras. Entre las más estudiadas se encuentra la metilación del DNA y la acetilación de las histonas. La metilación en el sistema inmune contribuye a controlar respuestas importantes que influyen en la fisiopatología de varias enfermedades autoinmunes. Actualmente, se están evaluando varios medicamentos que están en fase I y II, basados en terapia epigenética para enfermedades autoinmunes. Este capítulo revisa algunos aspectos sobre la metilación del DNA y la deacetilación de histonas con énfasis en el sistema inmunológico, enfermedades autoinmunes y las posibles herramientas terapéuticas.

Contenido

Metilación del DNA
Demetilación del DNA
Estructura de la cromatina
Acetilación de las histonas
Epigenética y medio ambiente
Metilación en el sistema inmune
Metilación y LES
La revolución del bisulfito
Terapia epigenética

Introducción

La metilación del DNA es la parte de la epigenética mejor estudiada y entendida, aunque también se puede incluir modificaciones etil, acetil, foforil y otras alteraciones de las histonas. Una de las posibles explicaciones funcionales de los cambios epigenéticos del genoma es que proveen un mecanismo más rápido por el cual un organismo puede responder al medio ambiente sin cambiar el DNA, que por cierto se dan en grandes espacios de tiempo. Por lo tanto, algunos autores han comparado a la genética como el "Hardware" y a la epigenética como el "Software" (3). Los cambios epigenéticos son sensibles a los cambios del ambiente, como se evidencia en el locus Agutí, que determina un tipo de color en ratones, los cuales a pesar de ser idénticos genéticamente, pueden poseer cambios en la metilación (4) (Figura 1). Así mismo, el estudio de la epigenética explica, por lo menos en parte, la contribución del medio ambiente en las enfermedades complejas.

Epigenética
Se define como el cambio en la expresión génica que ocurre sin ninguna modificación en la secuencia del DNA.

Herencia epigenética
La transmisión de información, ya sea por mitosis o meiosis, que no es mediada por DNA (1).

Epialelo
Genes con diferente grado de metilación en loci iguales de cromosomas homólogos.

Epigenoma
Patrones de metilación y modificaciones de las histonas.

Terapia epigenética
Medicamentos dirigidos a modificar los marcadores epigenéticos (2).

Metilación del DNA

La metilación del DNA, es uno de los mecanismos de supresión de la expresión génica y el principal regulador de los genomas *in vivo*.

En mamíferos, la metilación del DNA se refiere a la inserción de un grupo metilo (CH_3) en la base nitrogenada citosina. De una manera detallada, es el cambio de la base deoxycitosina (dC) en la posición 5 para formar deoxymetilcitosina (d^mC), en presencia de un sustrato que dona los grupos metilo y una enzima que se encarga de transferir dichos grupos (Figura 2). Las d^mC se encuentran en los dinucleótidos CG, de las cuales entre un 70-80% se encuentran metiladas. Muchas secuencias CGs llamadas islas CpG (por encontrarse en grupos y unidas por grupos fosfato), son en su mayoría no metiladas. Las islas CpG contienen múltiples sitios de unión a factores de trascripción y sirven como promotores de genes asociados. Aproximadamente la mitad de los genes están asociados a islas CpG (5).

La metilación del DNA es mediada por una familia de proteínas llamadas DNA metiltransferasas (Mtasas) que

FIGURA 1.
Genomas iguales pero diferentes epigenomas.
Variabilidad en metilación de las islas CpG en el locus agutí, causa diferencias en el color de los ratones a pesar de ser idénticos genéticamente. La nutrición materna afecta el fenotipo de los hijos por su influencia en el grado de metilación de las islas CpG en el locus agutí.

incluyen Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Dnmt1 es una enzima de mantenimiento que sostiene la metilación a través de las divisiones celulares, es decir metila a partir de cadenas de DNA hemimetiladas. Dnmt3a y Dnmt3b, son capaces de metilar DNAs que no habían estado metilados. Esto se conoce como metilación *de novo* (6).

La importancia de la metilación en la homeostasis es evidenciada por las diferentes patologías que ocasiona cuando existe alguna falla en dicho proceso. Las funciones de la metilación del DNA y sus implicaciones en patología son resumidas en la Tabla 1 y 2.

Otras enzimas importante en el proceso son las demetilasas. Éstas ayudan a remover grupos metilo de los residuos d^mC y actúan en expresión de genes que no están involucrados con la división celular. En la Figura 3 se muestran los mecanismos por los cuales la metilación inhibe la transcripción (7-8).

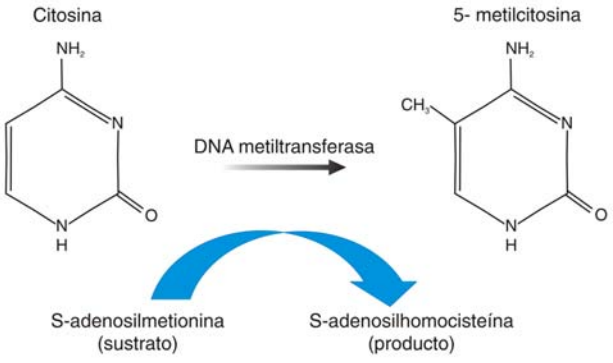


FIGURA 2.
Metilación de la citosina.
La DNA metiltransferasa cataliza la transferencia de grupos metilo del sustrato S-adenosilmetionina a la citosina, produciendo 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína.

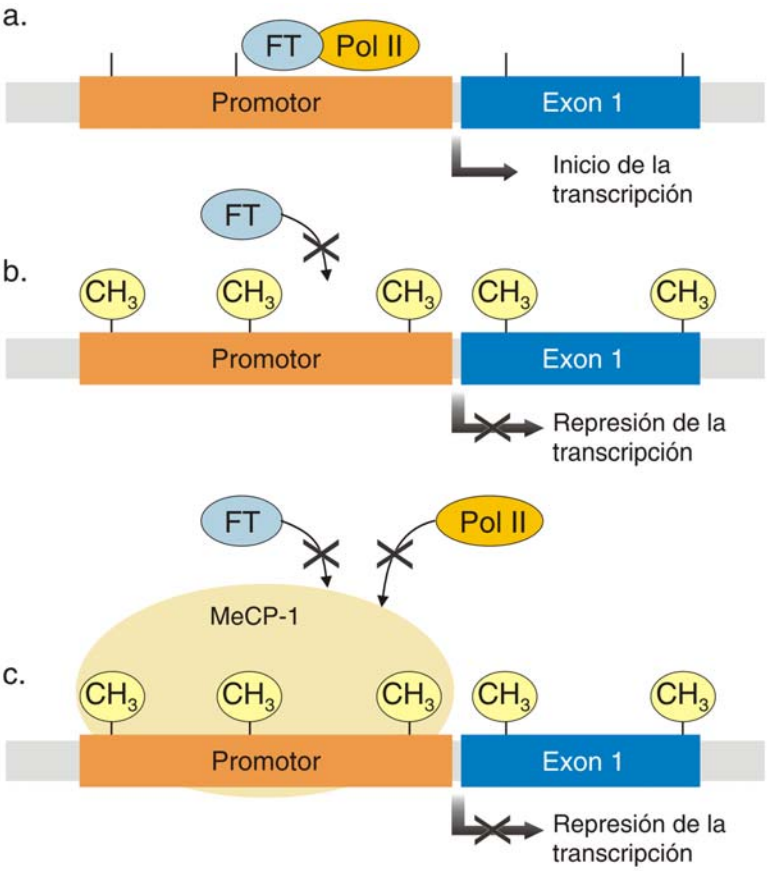


FIGURA 3.
Mecanismos de represión transcripcional mediada por citosinas.
a. La falta de 5 metilcitosina en la secuencia del promotor no inhibe la unión del factor de transcripción (FT) ni la RNA polimerasa II (Pol II). b. La presencia de 5 metilcitosina en el promotor inhibe la unión de los factores de transcripción, que incluyen Ap-2, E2F y NFkB. El represor transcripcional específico MeCP-1 interactúa con la 5 metilcitosina e interfiere con la unión de TF y Pol II a la secuencia blanco.

TABLA 1. Funciones de la metilación del DNA.

Funciones metilación del DNA	Mecanismo de acción explicado por metilación
Diferenciación celular	Está implicado en la diferenciación Th1-Th2 de los linfocitos T
Impronta genética	Solo alguno de los dos alelos es expresado, sea del padre o de la madre
Inactivación del cromosoma X	En las mujeres una de las dos copias del cromosoma X está inactivado para garantizar una igual dosis génica entre hombres y mujeres
Supresión de DNA parásitos	Elementos de DNA móviles como retrotransposones son inactivados, la metilación también es un mecanismo de defensa
Supresión de la transcripción	Físicamente, los factores de transcripción no pueden unirse a los promotores
Mantenimiento de la cromatina	Suprime la actividad génica

TABLA 2. Alteraciones en la metilación del DNA.

Enfermedad	Mecanismo de acción
Síndrome de Rett	Deficiencia de MeCP2
Síndrome ICF	Deficiencia de Dnmt3b
Síndrome de PW	Error en la impronta genética
Síndrome de Angelman	Error en la impronta genética
Síndrome de BW	Error en la impronta genética
Síndrome de fragilidad del X	Metilación anormal del cromosoma X, expansión de la metilación en la repetición CGG de la región 5'UTR del gen FMR1
α-Talasemia	Anemia, metilación de la isla CpG en la α-globina, deficiencia de HBA1 y HBQ1
Síndrome ATR-X	Mutaciones en el gen ATR-X, hipometilación de ciertas repeticiones y secuencias satélites del genoma
Cáncer	Hipometilación: aumento en la expresión de protooncogenes, translocaciones cromosómicas y mutaciones. Hipermetilaciones: inactivación de genes supresores de tumores
LES inducido por medicamentos	Hipometilación de genes de células T; por medicamentos como Procainamida e Hidralazina
LES idiopático	Hipometilación de genes de células T

ICF: Inmunodeficiencia-inestabilidad centromérica-anormalidades faciales; BW: Beckwith-Wiedemann; MeCP2: Proteinas de unión a citosinas metiladas; Dnmt: DNA metiltransferasas; PW: síndrome de Prader Willi; UTR: regiones no traducidas; LES: Lupus eritematoso sitémico.

Demetilación del DNA

La demetilación del DNA involucra dos mecanismos, pasivo y activo. El mecanismo pasivo ocurre cuando la enzima Dmnt1 es incapaz de metilar el DNA recientemente sintetizado durante la replicación. Este es el mecanismo por el cual 5-azaC, un inhibidor reversible de las metilasas, produce hipometilación del DNA y algunas proteínas de unión al DNA pueden bloquear la metilación de las citosinas en la fase S (síntesis) del ciclo celular (9). El segundo mecanismo involucra las demetilasas. Un ejemplo de enzimas demetilasas es la DNA glicosilasa 5-metilcitosina (5-MCDG) que es dependiente de RNA para realizar su función de remover grupos metil. Ambos, enzima y RNA, existen en forma de complejos largos que también contienen RNA helicasas y una enzima reparadora con actividad glicosilasa (10). Una de la proteínas de unión a la metilcitosina, la MBD4, posee también actividad demetilasa similar a 5-MCDG (11).

Estructura de la cromatina

La estructura de la cromatina en los nucleosomas es un importante regulador de la expresión génica y en unión con la metilación del DNA y la acetilación de las histonas, proporcionan el control de la misma. La cromatina abierta o eucromatina es señal de expresión génica, explicado en parte, por la accesibilidad de factores de transcripción a las zonas promotoras de los genes. La cromatina cerrada o heterocromatina, es frecuentemente asociada con represión de la transcripción (12).

Acetilación de las histonas

La acetilación de las histonas, es el mecanismo por el cual estas adquieren grupos acetilo en los aminoácidos de cadenas laterales que están en contacto con el DNA. La acetilación también contribuye al estado abierto de la cromatina y por lo tanto al aumento en la expresión génica. La acetilación ocurre específicamente en el aminoácido "lisina" catalizado por una enzima llamada acetilasa de histonas, en la región N terminal en la parte final de las histonas H3 y H4 en las partes centrales de los nucleosomas, limitando interacciones entre estas partes finales y residuos ácidos de las histonas H2A y H2B, favoreciendo la apertura de la cromatina. De otro lado, cuando la cromatina se condensa es por la deacetilación de las lisinas por enzimas deacetilasas de histonas (HDAC) (13).

Los procesos de metilación y acetilación trabajan de una manera sinérgica, ya que la proteína MECP2 se une a CpGs metiladas y reune a las deacetilasas de histonas (14,15). Además la Dnmt1 trabaja asociada a la deacetilasa de histonas (16).

Epigenética y medio ambiente

El niquel y el arsénico son potentes carcinogénicos, sin embargo su asociación con autoinmunidad no se ha investigado. El efecto epigenético del niquel (Ni), fue evidenciado en heterocromatina. Dentro del núcleo, el Ni se une selectivamente a la heterocromatina, ya que contiene mas relación proteína/DNA y por lo tanto más sitios potenciales de unión (17). El Ni se une, tanto a histonas como a otras proteínas, y en especial a la histona H1 (18). Otros sitios de unión han sido demostrados específicos como en hsitonas H2A y H4.

El efecto epigenético del arsénico necesita del mismo sustrato que usan las Dnmtasas, por lo tanto compiten por el sustrato y los genes que deberían ser metilados, quedan hipometilados. Por lo general, dichos genes, son reguladores de la proliferación celular (19).

Metilación en el sistema inmune

El descubrimiento de la metilación del DNA se realizó en timo de becerros, en 1948 (20). Posteriormente, los estudios en metilación han beneficiado enormemente el entendimiento de la epigenética en el sistema inmune. La metilación controla varios procesos homeostáticos como la hematopoyesis, competencia inmune, autoinmunidad, repertorio de receptores de antígenos, reactividad antigénica, ciclos de vida virales, vigilancia de células tumorales y cambios en el sistema inmune relacionados con la edad. La accesibilidad de los genes para el receptor de célula T (TCR) y el receptor de célula B (BCR) influyen en el repertorio que presentan dichos receptores y dependen en gran parte, de la regulación epigenética, específicamente en la tasa de metilación/demetilación del DNA.

La metilación y demetilación dinámica del DNA, regula el desarrollo de diferentes líneas de células T como también activan, diferencian y reexpresan moléculas coreceptoras de CD4+, CD8+, expresión de citoquinas tipo interleuquina 2 (IL-2), IL-4, e IFNγ, y diferenciación celular de linfocitos T CD4+ vírgenes ya sea a Th1 ó Th2 (21).

En la regulación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, la metilación juega un papel importante a través del gen transactivador clase II (CIITA) (22), en respuestas antígeno-específicas, tumorales y de autoantígenos. Claramente la metilación controla aspectos claves del sistema inmune periférico en el desarrollo de células específicas del contexto y de la actividad requerida del momento. En la parte inicial de este capítulo se comentaba que los cambios epigenéticos eran más rápidos que los cambios genéticos del DNA, de acuerdo con esto, el sistema inmune ha tomado esta herramienta para poder ponerse a tono con los desafíos del medio (Figura 4).

Proteínas de varios virus que son altamente inmunogénicas son mantenidas en un estado silente por mecanismos de latencia reversible de las regiones promotoras virales, facilitando que no sean reconocidos por células T citotóxicas (23-25).

El sistema inmune reconoce como extraños dinucleótidos CG que no están metilados, los cuales pueden activar tanto la inmunidad innata como adaptativa. Nucleótidos sintéticos no metilados (ODNs) han sido ensayados para modular actividades inmunológicas. Dos clases de ODNs se han trabajado, el tipo K y el tipo D, para estimu-

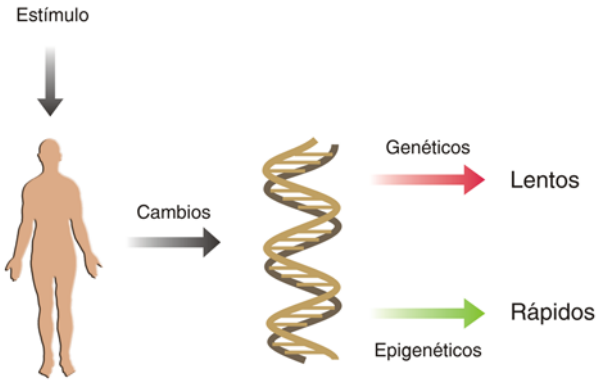


FIGURA 4.
Los cambios genéticos del DNA son más lentos que los cambios epigenéticos.

lar células de sangre periférica, con el objetivo de mirar su comportamiento y ser usados en adjuvantes para vacunas y como terapia potencial de cáncer, asma y alergia (26).

Niveles exagerados en metilación del DNA estimulan el desarrollo de células T autorreactivas y por lo tanto, de autoinmunidad. Inhibidores exógenos de la metilación de células T, como procainamida (medicamento usado en arritmias cardíacas) e hidralazina (medicamento usado en crisis hipertensivas) provocan una enfermedad tipo lupus eritematoso sistémico (LES) o también coinciden con varias de las manifestaciones clínicas del LES idiopático. Estos tratamientos causan expresión anormal de genes claves en autoinmunidad y reduce la cantidad de células CD4+, posiblemente también disminuya la producción de células T reguladoras (27).

La hipometilación de células T *in vivo* causa producción de anticuerpos anti-DNA a través de la estimulación de las células B, con implicaciones letales para macrófagos y en general para células presentadoras de antígenos (CPAs). Éstos efectos pleiotrópicos sobre la respuesta inmune son explicados, en parte, por niveles alterados en las moléculas de adhesión y por una disminución en la limpieza de cuerpos apoptóticos, debido al poco número de CPAs (28).

La hipometilación del DNA se cree que también pueda estar implicada en otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea, escleroderma y síndrome de Sjögren. A este respecto, ensayos en modelos murinos para dichas patologías han mostrado una tasa de metilación menor con respecto de ratones normales (29).

Metilación y LES

Un resumen de los estudios realizados en metilación y autoinmunidad en orden cronológico, es ilustrado en la Tabla 3.

En el LES se conoce un aumento en la autorrectividad celular, debida en parte, a moléculas de adhesión tipo LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos), involucrada en la activación celular T, la cual en el laboratorio es inducida por el agente demetilante 5-aza C. El aumento en la expresión de LFA-1 parece ser suficiente para causar autorreactividad, como se observó en pacientes con LES (38). Las células de estos pacientes transfectadas con LFA-1 pueden inducir una enfermedad tipo LES *in vivo* (44). También, la expresión aumentada de perforinas en células T de pacientes con LES es inducida por hipometilación y se correlaciona con el aumento en la cantidad de células apoptóticas en estos pacientes (45). Transferencia de clones de células T tratadas con 5-azaC en ratones puede causar varias manifestaciones como

TABLA 3. Metilación del DNA en autoinmunidad y LES.

Autor	Resumen	Ref
Richardson et al	Clones de células T autorreactivas mediados por 5-azaC	30
Sano et al	La hipermetilación produce disminución en la expresión de moléculas HLA-DR en células B de pacientes con LES	31
Evans	El aumento en la expresión del gen c-myc dependiente de hipometilación en células T MRL/lpr	32
Niwa	Actividad aumentada de la Dnmt en linfocitos de pacientes con LES	33
Eleftheriades et al	La metilación no se correlaciona con el aumento en la expresión de c-myc	34
Yoshida et al	Efecto protector de 5-azaC en el desarrollo de Autoinmunidad en ratones MRL/lpr	35
Richardson et al	Falla en la metilación de células de pacientes con LES	36
Shauenstein et al	Tiroiditis autoinmune en pollos es inducida por 5-azaC	37
Richardson et al	Clones de células T de controles sanos que fueron tratadas con 5-azaC desarrollaron características similares a LES, como aumento en la expresión de LFA-1	38
Quddus et al	Inducción de autoinmunidad en ratones por transferencia de células T tratadas con procainamida o 5azaC	39
Yung et al	Inducción de manifestaciones tipo lupus *in vivo* e *in vitro* por células de ratones que fueron tratadas con 5-azaC o procainamida	40
Mizugaki et al	Cambios en los niveles de metilación en diferentes órganos de ratones MRL/lpr con el envejecimiento	41
Deng et al	Hipometilación del DNA en células T de pacientes con LES es regulado por la vía de señalización ras-MAPK	42
Okada et al	Función importante de la hipometilación en la transcripción de HERV en LES	43

LES: lupus eritematoso sistémico; HERV: retrovirus endógenos; ras-MAPK: vía de las MPAP kinasas activadas por la proteína mitogénica ras

anticuerpos anti-DNA, glomerulonefritis por inmunocomplejos, daños en sistema nervioso central y alveolitis pulmonar (39,40).

La hipometilación ha sido explicada también por la disminución en la señalización celular en la vía mediada por la kinasa ras-MAPK (proteína-kinasa activada por el mitógeno ras) (42). Un estudio en pacientes con LES encontró una hipermetilación de neutrófilos y células B que estaba correlacionado con la baja expresión de moléculas HLA-DR (31,33). Varios estudios se han realizado sobre metilación llevados a cabo en modelos murinos de LES como MRL/lpr, el cual produce varios autoanticuerpos y desarrolla nefritis lúpica asociada con linfadenopatía debido a la expansión de un fenotipo celular T. En estos ratones la metilación de genes del timo y de nódulos linfáticos disminuye con la edad. En el bazo sucede lo contrario, aumenta la metilación de sus genes y por lo tanto con la progresión de la enfermedad (41). La administración de 5-AzaC a estos ratones, aumenta su promedio de vida, disminuye la linfadenopatía, esplenomegalia y los niveles de anticuerpos circulantes. Este tratamiento también reduce la metilación en nódulos linfáticos auxiliares y en el bazo. Sin embargo estos efectos no han podido ser demostrados en otros ratones con LES (35). Es posible que la sensibilidad de la metilación a 5-azaC, difiera entre órganos linfoides y que sea particular a cada cepa de ratones. En pollos se ha reportado que el tratamiento con 5-azaC causa enfermedades autoinmunes como hipotiroidismo (37).

La demetilación o hipometilación resulta en un incremento de la transcripción génica y por lo tanto, esta hipometilación de algunos genes claves puede desencadenar LES. Sin embargo la metilación de cada gen y de cada órgano puede ser diferente tanto para humano como para ratón. La hipometilación, especialmente en células T, hace parte de los mecanismos inductores del LES (46).

Algunos DNAs bacterianos y virales, los cuales son ricos en islas CpG no metiladas, inducen varios cambios tanto *in vivo* como *in vitro* similares a los observados en LES, como son activación policlonal de células B, producción de anticuerpos anti-DNA, secreción de IL-6 y resistencia a la apoptosis (47-49). La relación entre el aumento en el grado de enfermedad después de una infección es bien conocido en la enfermedad, indicando que uno de las posibles conexiones entre autoinmunidad e infección sea a través de mecanismos epigenéticos. De acuerdo con esto, ciertos ODNs sintéticos que contienen CpGs no metiladas pueden inducir activación policlonal y anticuerpos anti-DNA (50).

Por otro lado, la combinación de apoptosis acelerada con el defecto en la limpieza de los cuerpos apoptóticos da como resultado un incremento en la liberación de nucleosomas con una metilación anormal de islas CpGs y por lo tanto resulta en una estimulación autóloga dando lugar a un rompimiento de la tolerancia en LES (51). Los pacientes con LES sin infección, tienen niveles elevados de DNA de bajo peso molecular circulando en plasma, el cual es rico en CpGs hipometiladas (52-54). Los ODNs en pacientes con LES aumentan el RNA mensajero de citoquinas como IL-12 e IFNγ. Así mismo, los ODNs que son ricos en CpGs no metiladas, derivadas de cuerpos apoptóticos y de bacterias forman complejos inmunes con anticuerpos anti-DNA (55).

El lupus inducido por drogas involucra un mecanismo importante en la metilación (56,57). Este ocurre con el tratamiento de ciertas drogas anteriormente mencionadas como procainamida e hidralazina. El 90% de lo pacientes que son tratados por más de dos años con procainamida, desarrollan anticuerpos antinucleares (ANAs) y el 20% de estos pacientes, desarrolla una enfermedad tipo LES (51). Estas drogas inhiben la metilación y, en condiciones experimentales, alteran la tasa de DNAs hipometilados contra los hipermetilados (58). Células T de ratón han llegado a ser autorreactivas después de ser expuestas a procainamida o hidralazina. El mecanismo de acción propuesto para el modo de acción de la hidralazina es ilustrado en la Figura 5 (59).

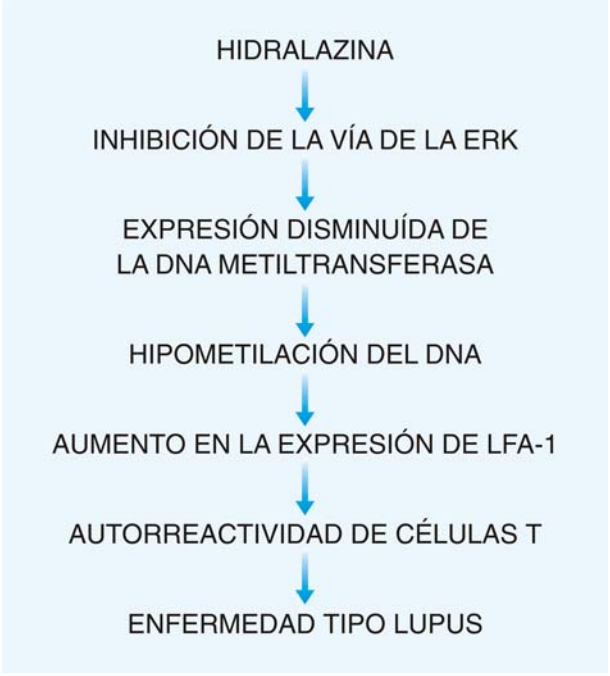

HIDRALAZINA
INHIBICIÓN DE LA VÍA DE LA ERK
EXPRESIÓN DISMINUÍDA DE LA DNA METILTRANSFERASA
HIPOMETILACIÓN DEL DNA
AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LFA-1
AUTORREACTIVIDAD DE CÉLULAS T
ENFERMEDAD TIPO LUPUS

FIGURA 5.
Mecanismo de acción propuesto para el lupus inducido por hidralazina.
La hidralazina produce anormalidad en la vía de señalización ERK y por lo tanto influye sobre la expresión de las Dnmts, inhibiendo esta vía y por lo tanto desencadenado autoinmunidad. ERK: kinasa reguladora de señal extracelular; LFA-1: antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos; Dnmts: DNA metiltransferasas.

La revolución del Bisulfito

La principal característica que ha posibilitado los estudios de metilación del DNA en su medición, es su afinidad por el bisulfito de sodio. El bisulfito tiene la propiedad de unirse a citosina (sin metilación) o a 5-metil citosina por un proceso de deaminación, convertirlo en uracilo y timina, res-

pectivamente (60). En adición con la PCR y secuenciación, el bisulfito permite obtener un patrón de metilación de una secuencia dada (Figura 6).

Terapia epigenética

El hecho de que varias enfermedades como autoinmunes, infecciosas y cáncer, tengan una gran influencia epigenética, ha llevado a pensar en nuevas estrategias terapéuticas, dando lugar a una nueva rama de la medicina, conocida como "terapia epigenética". Aquellos agentes que alteran el estado de hipermetilación/hipometilación están siendo evaluados para tratamientos clínicos (Tabla 4).

Inhibidores de la metilación del DNA, reactivan rápidamente la expresión de genes que han sufrido silenciamiento epigenético, especialmenbte en condición patológica. Los inhibidores de metilación más importantes hasta el momento son 5-aza-CR y 5-aza-CdR, que fueron desarrollados en un principio como agentes citotóxicos (61), pero posteriormente, se descubrió su acción sobre la activación génica en cultivos celulares (62,63). Ambos, son análogos de nucleósidos que son convertidos a deoxinucleótidos de trifosfato y son incorporados en la nueva hebra que se está duplicando (Figura 7). Por lo tanto estos agentes sólo son activos en la fase S del ciclo celular pero con un mecanismo poderoso de activación celular basados en inhibición de la metilación (63).

Tabla 4. Medicamentos epigenéticos.

Blanco	Medicamento	Fase clínica
Metilación del DNA	5-azacitidina	Fase I/II/III
	5-Aza-2´-deoxicitidina	Fase I/II/III
	FCDR	
	Zebularina	
	Procainamida	
	EGCG	Fase I
	Psammaplin A	
	Oligómeros anti-sentido	Fase I
Deacetilasas de Histonas	Acido fenilbutírico	Fase I/II
	SAHA	Fase I/II
	Depsipéptido	Fase I/II
	Ácido valproico	Fase I/II

EGCG: epigalocatequina-3 galato; FDCR: 5-fluoro-2´deoxicitidina; SAHA: ácido suberoilanilide hidroxámico.

Las Dnmts detectan bases modificadas como azacitosina, 5 fluorocitosina, seudoisocitosina, resultando en la formación de nuevo DNA hipometilado (64).

El silenciamiento epigenético ha sido realizado con la deacetilación de las histonas el cual es realizado por tres tipos de enzimas HDAC. Los inhibidores de HDAC pueden inducir diferenciación, anquilosamiento en el crecimiento y apoptosis (65). La acumulación de proteínas aceti-

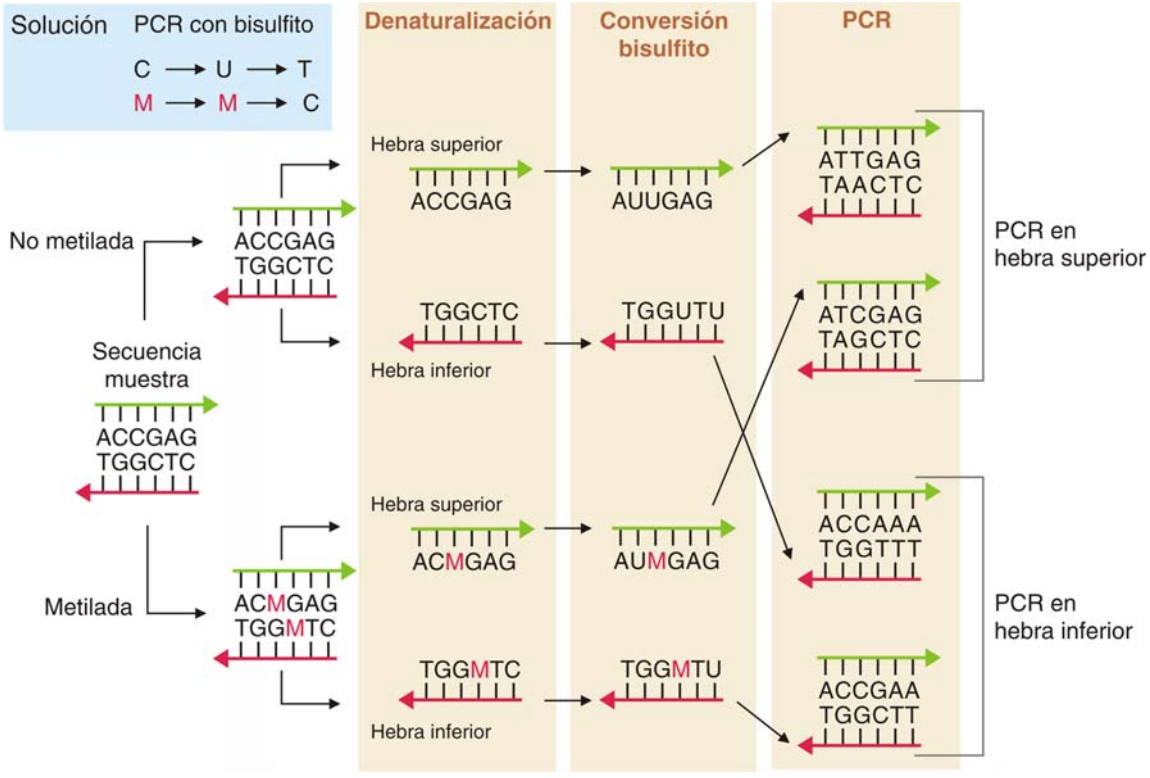


Figura 6. Principio de la conversión por bisulfito de sodio.
Técnicas de biología molecular para analizar loci individuales como la PCR y clonación, no permiten dar a conocer el grado de metilación de una secuencia dada, por lo tanto se conoce la información genética pero la epigenética se pierde, porque queda en el genoma original. La solución a este problema es la modificación del DNA antes de ser amplificado. Esto se puede hacer por enzimas de restricción sensibles a metilación o por DNA con bisulfito de sodio, que convierte citosinas no metiladas en uracilos. Como consecuencia, el DNA transformado necesita diferentes cebadores.

ladas, particularmente histonas, resulta en la inducción de genes y en aumento de la función en otros genes que han sido silenciados epigenéticamente. Varios inhibidores de HDAC está siendo evaluados en fase I y fase II, lo cual en un futuro será de gran valor para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Además se necesitan investigaciones posteriores que ayuden a entender los fenómenos epigenéticos .

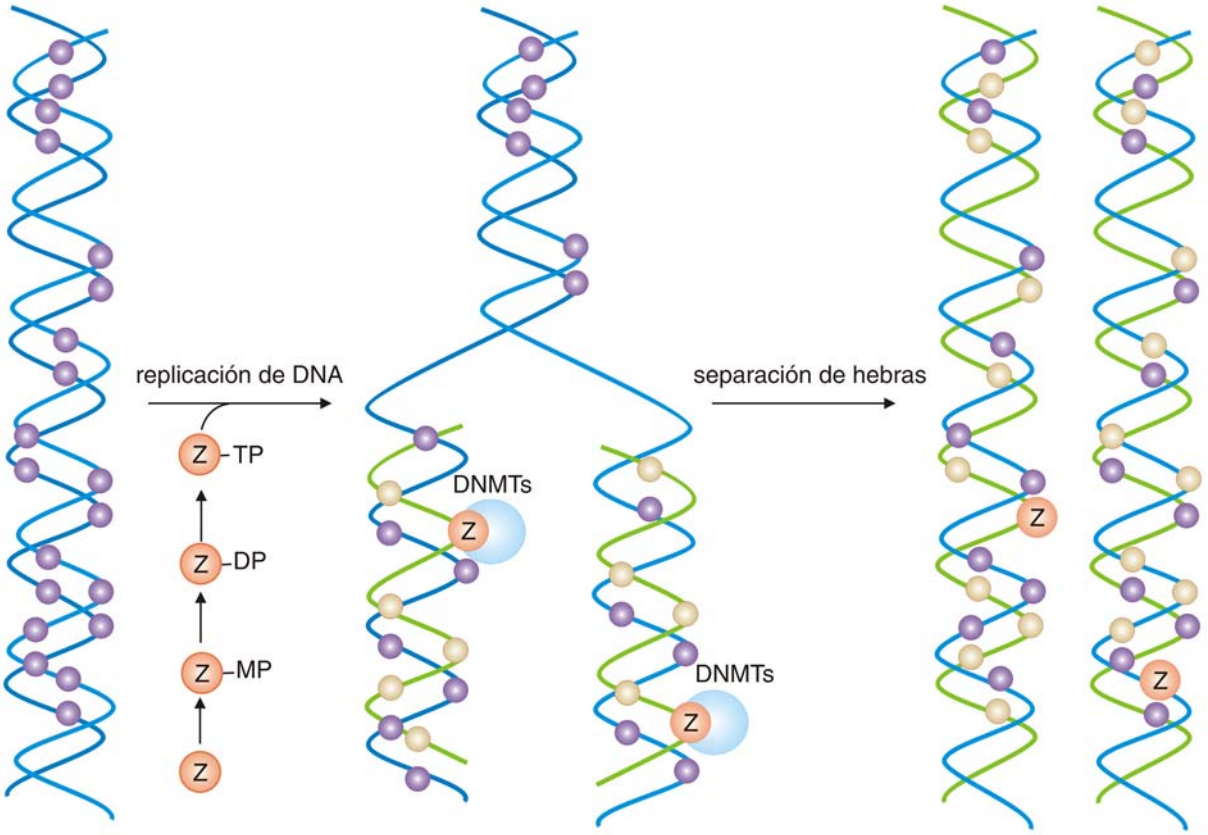


FIGURA 7. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos con propiedades para inhibir la metilación. Los análogos de nucleósidos como 5-azaC (representado por la Z) es convertido en trifosfato en la fase S del ciclo celular y es incorpoprado en el sitio de la citosina en la hebra nueva. Una vez están en el DNA, estas bases "fraudulentas" forman enlaces covalentes con las metiltransferasas de DNA (Dnmts) resultando en la demetilación del DNA. círculos rosados: CpG metiladas, círculos claros: CpG no metiladas.

Referencias

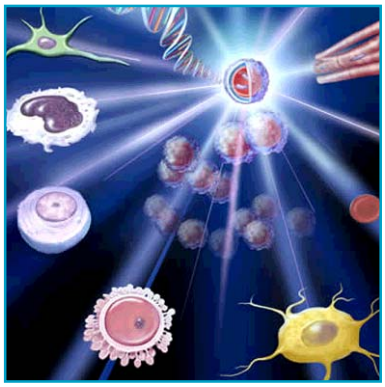
1. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science 1999; 286:481-486
2. Lederberg J. The meaning of epigenetics. The scientist 2001; 15:6
3. Pray LA. Epigenetics: Genome, Meet your Environment. The scientist 2004; 18:14
4. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. Mol Cell Biol, 23:5293-5300
5. Richardson B, Yung R. Role of DNA methylation in the regulation of cell function. J Clin Med 1999; 134:333-340
6. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. Gene 2001; 278:25-31.
7. Rountree MR, Selker EU. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in Neurospora crassa. Genes Dev 1997; 11:2383-2395
8. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev 1993; 3:226-231
9. Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:5894-5896.
10. Jost JP, Schwarz S, Hess D, et al. A chicken embryo protein related to the mammalian DEAD box protein p68 is tightly associated with the highly purified protein-RNA complex of 5-MeC-DNA glycosylase. Nucleic Acid Res 1999; 27:3245-3252
11. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, et al. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. Nature 1999; 401:301-304
12. Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. Semin Cancer Biol 1999; 5:339-347
13. Wolffe AP. Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. J Exp Zool 1998; 282:239-244
14. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature 1998; 6683: 611-612
15. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998; 19:187-191.
16. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, et al. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. Nat Genet 2000; 24:88-91
17. Sen P, Costa M. Pathway of nickel uptake influences its interaction with heterochromatic DNA. Toxicol Appl Pharmacol 1986; 84:278-285
18. Patierno SR, Costa M. Effects of nickel(II) on nuclear protein binding to DNA in intact mammalian cells. Cancer Biocem Biophys 1987; 9:113-126
19. Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, et al. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:10907-10912.
20. Hochkiss. The quantitative separation of purine, pyrimidines and nucleoside by paper chromatography. J Biol Chem 1948; 168:315-332

21. Teitell M, Richardson B. DNA methylation in the immune system. Clin Immunol 2003; 109:2-5
22. van den Elsen PJ, Holling TM, van der Stoep N, et al. DNA methylation and expression of major histocompatibility complex class I and class II transactivator genes in human developmental tumor cells and in T cell malignancies. Clin Immunol 2003; 109:46-52
23. Ambinder RF, Robertson KD, Tao Q. DNA methylation and the Epstein-Barr virus. Sem Cancer Biol 1999; 9:369-375
24. Paulson EJ, Speck SH. Differential methylation of Epstein-Barr virus latency promoters facilitates viral persistence in healthy seropositive individuals. J Virol 1999; 73:9959-9968
25. Tierney RJ, Kirby HE, Nagra JK, et al. Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. J Virol 2000; 74:10468-10479
26. Klinman DM, Takeshita F, Gursel I, et al. CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. Microbes Infect 2002; 9:897-901
27. Yung R, Chang S, Hemati N, et al. Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. Arthritis Rheum 1997; 40:1436-1443
28. Richardson B, Ray D, Yung R. Murine models of lupus induced by hypomethylated T cells. Methods Mol Med 2004; 102:285-294
29. Richardson B. DNA methylation and autoimmune disease. Clin Immunol 2003; 109:72-79
30. Richardson B. Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. II. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. Hum Immunol 1986; 17:456-470
31. Sano H, Compton LJ, Shiomi N, et al. Low expression of human histocompatibility leukocyte antigen-DR is associated with hypermethylation of human histocompatibility leukocyte antigen-DR alpha gene regions in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1985; 76:1314-1322
32. Evans JL, Boyle WJ, Ting JP. Molecular basis of elevated c-myb expression in the abnormal L3T4-, Lyt-2- T lymphocytes of autoimmune mice. J Immunol 1987; 139:3497-3505
33. Niwa Y, Miyachi Y, Sakane T, et al. Methyltransferase and phospholipase A2 activity in the cell membrane of neutrophils and lymphocytes from patients with Behcet's disease, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta 1988; 174:1-14
34. Eleftheriades EG, Boumpas DT, Balow JE, et al. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms are responsible for the increased expression of c-myc protooncogene in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1989; 52:507-15
35. Yoshida H, Yoshida M, Merino R, et al. 5-Azacytidine inhibits the lpr gene-induced lymphadenopathy and acceleration of lupus-like syndrome in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. Eur J Immunol 1990; 20:1989-1993
36. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, et al. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990; 33:1665-1673
37. Schauenstein K, Csordas A, Kromer G, et al. In-vivo treatment with 5-azacytidine causes degeneration of central lymphatic organs and induces autoimmune disease in the chicken. Int J Exp Pathol 1991; 72:311-318
38. Richardson BC, Strahler JR, Pivirotto TS, et al. Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1992; 35:647-662
39. Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, et al. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. J Clin Invest 1993; 92:38-53
40. Yung RL, Quddus J, Chrisp C, et al. Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. J Immunol 1995; 154:3025-3035
41. Mizugaki M, Yamaguchi T, Ishiwata S, et al. Alteration of DNA methylation levels in MRL lupus mice. Clin Exp Immunol 1997; 110:265-269
42. Deng C, Kaplan MJ, Yang J, et al. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. Arthritis Rheum 2001; 44:397-407
43. Okada M, Ogasawara H, Kaneko H, et al. Role of DNA methylation in transcription of human endogenous retrovirus in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2002; 29:1678-1682
44. Yung R, Powers D, Johnson K, et al. Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice. J Clin Invest 1996; 97:2866-2871
45. Kaplan MJ, Attwood J, Richardson BC, et al. DNA methylation and perforin expression in normal and lupus T cells. Arthritis Rheum 2001; 44 suppl 9:S895
46. Yung RL, Richardson BC. Role of T cell DNA methylation in lupus syndromes. Lupus 1994; 3:487-491
47. Gilkeson GS, Bloom DD, Pisetsky DS, et al. Molecular characterization of anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with bacterial DNA. Differences from spontaneous anti-DNA in the content and location of VH CDR3 arginines. J Immunol 1993; 151:1353-1364
48. Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?. J Clin Immunol 1995; 15:284-292
49. Huck S, Zouali M. DNA methylation: a potential pathway to abnormal autoreactive lupus B cells. Clin Immunol Immunopathol 1996; 80:1-8
50. Liang H, Nishioka Y, Reich CF, et al. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. J Clin Invest 1996; 98:1119-1129
51. Huck S, Deveaud E, Namane A, et al. Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undergoing apoptosis. FASEB J 1999; 13:1415-1422
52. Ogasawara H, Okada M, Kaneko H, et al. Quantitative comparison of human endogenous retrovirus mRNA between SLE and rheumatoid arthritis. Lupus 2001; 10:517-518
53. Ogasawara H, Naito T, Kaneko H, et al. Quantitative analyses of messenger RNA of human endogenous retrovirus in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2001; 28:533-538
54. Hishikawa T, Ogasawara H, Kaneko H, et al. Detection of antibodies to a recombinant gag protein derived from human endogenous retrovirus clone 4-1 in autoimmune diseases. Viral Immunol 1997; 10:137-147
55. Vallin H, Perers A, Alm GV, et al. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. J Immunol 1999; 163:6306-6313
56. Yung RL, Richardson BC. Drug-induced lupus. Rheum Dis Clin North Am 1994; 20:61-86
57. Goff PL, Saraux A. Drug-induced lupus. Rev Rheum 1999; 66:40-45
58. Pisetsky DS. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. Immunity 1996; 5:303-310
59. Deng C, Lu Q, Zhang Z, et al. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. Arthritis Rheum 2003; 48:746-756
60. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89:1827-1831.
61. Sorm E, Piskala A, Chihak A, et al. 5-azacytidine, a new, higly effective cancerostatic. Experentia 1964; 20:202-203
62. Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. Nature 1977; 267:364-366
63. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell 1980; 20:85-93
64. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, et al. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. J Biol Chem 2002; 321: 591-599
65. Xiao H, Hasegawa T, Isobe K. Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. J Cell Biochem 1999; 73:291-302

38

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Carlos Enrique Toro
Carlos A. Cañas D.
Ricardo Pineda-Tamayo



Contenido

Tipos de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT)
Base racional para el uso de HSCT
Mecanismo terapéuticos del HSCT
Técnica del procedimiento
Utilidad del HSCT
Identificación de candidatos
Resultados
Complicaciones

La relación entre enfermedad autoinmune y células madre hematopoyéticas fue descrita desde hace varias décadas. El trasplante de células madre hematopoyéticas consiste en el uso terapéutico de inmunosupresión en una dosificación variable, seguida por la infusión de células madre propias o extrañas (autólogo o alogénico, respectivamente) con el objeto de recapitular la ontogénesis y de este modo, reinducir la autotolerancia perdida en estas enfermedades autoinmunes. El trasplante de células madre es un procedimiento que cada día demuestra su utilidad en una serie de enfermedades autoinmunes. No obstante, los riesgos inherentes al procedimiento, los costos y los criterios de selección de candidatos, hacen que el uso de esta terapia continúe siendo controversial.

Introducción

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por una alteración en la regulación inmune, seguida por pérdida de la autotolerancia. De acuerdo con este concepto, la reinducción de la autotolerancia puede ser una estrategia efectiva para el manejo de diferentes EAI (1,2). No obstante, las EAI se caracterizan por presentar una respuesta variable e impredecible al tratamiento inmunosupresor, por lo cual su adecuado manejo se ha constituido en una de las áreas más desafiantes de la medicina. La capacidad del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, del inglés hematopoietic stem cell transplantation) para alterar o reemplazar la población de linfocitos y reinducir tolerancia está siendo evaluada, experimental y clínicamente, y se constituye en una estrategia más para el manejo de las EAI (3).

Una célula madre posee dos propiedades; la primera, se trata de una célula que puede dividirse indefinidamente, siendo sus células hijas idénticas a ella; y segunda, puede también dividirse en dos células hijas diferentes, siendo una idéntica y la otra no. Esta última contiene un diferente tipo de información genética y posee una capacidad de replicación limitada (Tabla 1) (4).

Tipos de HSCT

Existe una variedad de tipos de HSCT dependiendo de las características del donante y el receptor (5).

- *Trasplante xenogénico:* Injerto que proviene de una especie diferente al receptor. No se utiliza para el manejo de EAI.
- *Trasplante alogénico:* Receptor y donante de la misma especie, con similitud del sistema de Antígeno Leucocitario Humano (HLA, del inglés Human Leukocyte Antigen). Debido a que existen diferencias significativas en los determinantes antigénicos menores, puede presentarse rechazo al aloinjerto.
- *Trasplante singénico:* Trasplante entre dos individuos genéticamente idénticos (gémelos idénticos).
- *Trasplante autólogo:* Se toman HSC (Hematopoietic Stem Cells) propias del individuo afectado, se procesan y almacenan para reinfundirse, luego de inmunosuprimir al paciente. El mayor riesgo relacionado con este procedimiento se debe a la persistencia de ciertos clones autorreactivos en la preparación transfundida, que pueden ser responsables de la persistencia o recurrencia de la enfermedad.
- *Trasplante relacionado versus no relacionado:* El trasplante alogénico usualmente se realiza entre individuos con HLA idénticos, relacionados. Sin embargo, el trasplante puede realizarse entre individuos que son HLA idénticos pero no relacionados, aunque ello acarrea un mayor riesgo de complicaciones.
- *Trasplante en personas no compatibles:* En ciertas circunstancias puede requerirse de trasplante de personas que no son del todo idénticas (relacionado o no relacionado). Por lo regular las complicaciones son mayores.

Base racional para el uso de HSCT en EAI

La sospecha inicial respecto al papel del sistema hematopoyético en EAI, fue el resultado de observaciones en modelos animales (6), en los que se encontraron defectos en su sistema hematopoyético, que podrían desempeñar un rol patológico en el desarrollo de EAI (7). Desde hace casi tres décadas, Morton (8) y Denman (9) describieron la relación entre EAI y HSCT, procedimiento utilizado en una amplia gama de enfermedades hematooncológicas, basados en observaciones realizadas en modelos murinos de HSCT. Esta observación fue soportada posteriormente, por el desarrollo de autoinmunidad en pacientes receptores de HSC (10-14), y por las características autoinmunes de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, del inglés graft versus host disease), complicación relativamente frecuente del HSCT alogénico (15,16).

El potencial terapéutico del trasplante medular alogénico se planteó por investigaciones en modelos animales de artritis adyuvante (AA) y encefalomielitis alérgica experimental (EAE), entidad que sirve como modelo de estudio para esclerosis múltiple (EM). Estos experimentos lograron un alto porcentaje de remisión en animales con EAI, mediante el reemplazo de su médula ósea (MO) con la de un donante normal (HSCT alogénico). Información reciente, sugiere que en modelos murinos de lupus y diabetes, la infusión de HSC alogénico combinada con dosis de radiación subletal resulta en un quimerismo estable entre receptor-donante y posterior supresión de la en-

Tabla 1. Introducción al concepto de células madre.

Tipo de célula o estructura	Concepto
Línea celular	Población homogénea de células autorregenerativas.
Línea celular clonada	Población derivada de la replicación de una sola célula.
Célula madre	Célula que se divide indefinidamente para producir una población de células hijas idénticas.
Célula precursora	Célula madre encargada de multiplicarse para producir un tipo específico de célula.
Célula totipotente	Célula señalada para un linaje específico que es capaz de producir todos los tipos de células diferenciadas y tejidos, incluyendo tejido extraembrionario.
Célula pluripotente	Célula no restringida a un linaje específico que puede producir todo tipo de células y tejidos, excepto tejido extraembrionario.
Célula multipotente	Célula precursora de diversos tipos de células en respuesta a apropiados estímulos ambientales.

Modificado de ref. 3.

fermedad. El término quimerismo en el contexto de HSCT, se refiere a la presencia de células linfohematopoyéticas provenientes del donante, las cuales son detectadas por técnicas de análisis de DNA. Este quimerismo puede ser mixto o completo, dependiendo de la presencia o ausencia de células linfohematopoyéticas del receptor junto con las del donante (17).

En el modelo de lupus murino y el modelo de diabetes murino NOD, se ha demostrado que la destrucción de linfocitos T (LT) maduros autorreactivos, seguido del reemplazo de MO con nuevas HSC, produce remisión de la enfermedad por tiempo prolongado (18). Posteriormente, se encontró con gran sorpresa que modelos animales de AA respondieron adecuadamente tanto al HSCT autólogo como al alogénico (19), lo que permitió ampliar el estudio en HSCT autólogo, justificado en los menores riesgos asociados a este tipo de trasplante. No obstante, estos modelos animales no pueden predecir completamente la respuesta clínica en humanos.

La capacidad de modificar la respuesta inmune en el receptor de HSC ha sido reportada en personas que han desarrollado patologías autoinmunes como miastenia gravis, tiroiditis, púrpura trombocitopénica autoinmune, psoriasis y enfermedad celíaca, luego del HSCT alogénico proveniente de donantes con estas patologías (3). Sin embargo, otros receptores de HSC de donantes con patologías como lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide (AR)(20), no han desarrollado tales enfermedades.

Así mismo, se revisaron los registros médicos de pacientes que recibieron HSCT alogénico, indicado por enfermedad hematooncológica, que tuviesen alguna EAI concomitante. Con sorpresa, se encontró completa remisión de la EAI luego del HSCT en varios registros médicos. Lo anterior, a pesar de ser un hallazgo incidental, sugiere claramente el potencial terapéutico de HSCT en el manejo de EAI. Por tanto, tales observaciones han permitido extraplorar un nuevo campo de investigación en la patogénesis y terapéutica de los procesos autoinmunes (21,22).

La base racional para el uso de HSCT alogénico en EAI resulta de las características mismas del procedimiento, en el cual se requiere de un esquema de inmunosupresión mieloablativo, que puede incluir irradiación corporal total, inmunoglobulinas o con mayor frecuencia, del uso de altas dosis de fármacos citotóxicos como ciclofosfamida (CYC), con el objetivo de remover la mayor cantidad posible de células efectoras del sistema inmune, para luego transferir células madre de un donante sano y lograr así quimerismo alogénico estable (23). Este procedimiento plantea eliminar los mecanismos efectores originales de la EAI (lo cual puede no ser completamente cierto), para luego instaurarse un nuevo sistema inmune, no influenciado por los mecanismos fisiopatológicos que habían liderado previamente el desarrollo de EAI. Existe, sin embargo, otro tipo de HSCT alogénico, en el cual se utilizan dosis menores de irradiación o fármacos citotóxicos y más regímenes citorreductores (con el uso de busulfán o melfalán), conocido como no mieloablativo (24), el cual se realiza cada vez con mayor frecuencia, con buenos resultados y menos efectos adversos como neutropenia y aplasia medular. Por otra parte, en el HSCT autólogo se toman HSC del propio paciente, las cuales sufren un proceso mieloablativo con el objeto de eliminar la mayor cantidad de células autorreactivas posible, para luego reinfundirse y reconstituir el sistema inmune del paciente (Tabla 2).

Tabla 2. Observaciones racionales que apoyan el papel de HSCT en EAI.

1. Autoinmunidad relacionada con LT y células precursoras autorreactivas
2. Modelos animales que sugieren un papel terapéutico para HSCT
3. Transferencia de EAI en receptores de HSCT indicado para el manejo de malignidad
4. Mejoría incidental de pacientes con EAI que van a HSCT por otras causas
5. Alteraciones del sistema inmune a largo plazo posterior a HSCT
6. Demostración de mejoría en EAI con el uso de agentes inmunosupresores
7. Uso rutinario de HSCT en el manejo de citopenias autoinmunes

Adaptado de ref. 5.

Mecanismos terapéuticos del HSCT

La principal teoría en cuanto al mecanismo terapéutico del HSCT, radica en su capacidad de destruir todas las células progenitoras y maduras autorreactivas, para luego reconstituir el sistema inmune mediante la infusión de HSC, lo que representa una recapitulación de la ontogénesis, con la posterior reinducción de la autotolerancia perdida (25-27). Otro objetivo inmunológico del HSCT, consiste en la reducción del número de células autorreactivas a bajos niveles que, aunque no alcanza una remisión completa, permiten "regresar" la enfermedad a una fase más temprana, más asequible al manejo convencional. Adicionalmente, por el uso de agentes citotóxicos se puede alterar el circuito inmunorregulador y reestablecer mecanismos de control inmune más efectivos (5).

Otras observaciones sugieren que el HSCT es, simplemente una terapia adjunta al manejo inmunosupresor (28-30), visto de este modo como una estrategia de rescate medular, con el objetivo de disminuir las complicaciones de la aplasia medular secundaria a la mieloablación. No obstante, la mayor evidencia sugiere que el HSCT modula directamente la respuesta inmune y contribuye a la mejoría clínica analizada (Tabla 3) (5).

Tabla 3. Objetivos inmunológicos de HSCT en EAI.

1. Destruir todas las células autorreactivas, reemplazarlas con un sistema inmune normal y recuperar la autotolerancia.
2. Reducir el mayor número de células autorreactivas a bajos niveles y lograr mejoría con el manejo convencional.
3. Alterar el circuito inmunorregulador con agentes citotóxicos y reestablecer un mecanismo de control inmune más efectivo.

Técnica del procedimiento

El trasplante exitoso de HSC involucra el desarrollo de seis pasos (Tabla 4) (5).

Primer paso

En la selección de pacientes se debe incluir aquellos que poseen una enfermedad suficientemente severa, tanto que la morbimortalidad relacionada al HSCT sea menor que el riesgo que representa la enfermedad de base. Los pacientes deben ser bien informados acerca de esta relación riesgo-beneficio.

Segundo paso

En este paso se toma la decisión acerca del tipo de HSCT, si se utiliza una fuente de células madre del propio individuo afectado (trasplante autólogo) o si se toman de otro individuo (trasplante alogénico). En la Tabla 5 se exponen las ventajas y desventajas propuestas para cada uno de estos tipos.

Tercer paso

Una vez tomada la decisión acerca del tipo de HSCT a realizarse, se debe considerar la técnica de obtención de HSC. De esta forma, las HSC pueden ser tomadas directamente mediante aspiración de médula ósea (MO) o ser obtenidas de células progenitoras de sangre periférica (PBPC, del inglés peripheral blood progenitor cells) luego de aféresis de sangre periférica. La ventaja del aspirado de MO se debe a la relativamente alta concentración de células madre, con una menor concentración de LT maduros, respecto a la sangre periférica. No obstante, la obtención de sangre periférica es un procedimiento más sencillo, que requiere una serie de condiciones previas a la toma de la muestra para estimular (movilizar) las células madre a la sangre periférica. De este modo, el uso de CYC, factor de crecimiento de colonias granulocíticas (GCSF) o ambos, aumentan el número de células madre CD34+, por un factor de 50 a 100 veces. El uso de GSCF en el proceso de movilización de células madre, puede inducir reactivación de la EAI (31).

Cuarto paso

Este paso se refiere al proceso de preparación del receptor de HSCT con agentes inmunosupresores con el objetivo de evitar el rechazo, eliminar linfocitos T (LT) autorreactivos y producir espacio medular para el crecimiento de las células trasplantadas. Los protocolos inmunosupresivos más utilizados incluyen CYC 200mg/kg, CYC más irradiación corporal total, globulina antitimocito (ATG) u otros anticuerpos dirigidos a LT, entre otros.

Quinto paso

Se ocupa de la infusión de HSC. Inicialmente la preparación se descongela al bañarse en agua a 40°c, para luego ser infundida de manera rápida (según tolerancia) sin retirar el crioprotector. Durante este paso se pueden presentar efectos adversos como náuseas, dolor abdominal, hipertensión y disnea. En general, el uso de PBPC libre de LT se asocia con menos sintomatología adversa.

Sexto paso

Aquí se debe llevar a cabo todo tipo de soporte postrasplante, hasta que la nueva MO inicie su producción de células periféricas. Este período de aplasia medular depende de numerosos factores entre los que se incluye el régimen inmunosupresor empleado, el tipo de HSCT y el número de células trasplantadas. Este período de aplasia medular ha logrado reducirse de 3 a 4 semanas a 7 a 10 días en promedio, con el uso de factores estimulantes de crecimiento de colonias hematopoyéticas. Se debe tener en cuenta que todos los productos a transfundirse deben ser adecuadamente irradiados para disminuir el riesgo de desarrollar GVHD, entidad producida por el paso de LT viables, inmunocompetentes, a receptores severamente inmunosuprimidos. Con mayor frecuencia este paso de LT se ha relacionado con la infusión de plaquetas.

Utilidad de HSCT en EAI

Las EAI se producen como consecuencia de la pérdida de la tolerancia a lo propio y el posterior desarrollo de autorreactividad contra antígenos propios. La reconstitución del sistema inmune luego de la mieloablación intensiva puede resultar en la readquisición de autotolerancia (32). La reconstitución de LT siguiendo HSCT presenta un patrón característico debido a que la terapia mieloablativa tímica y extratímica produce una reducción significativa del conteo absoluto de LT CD4 (33). A pesar que la población de LT se reconstituye luego del trasplante, la población específica de CD4 puede permanecer baja hasta por unos 10 años (34,35). Al evaluar los resultados de

Tabla 4. Pasos secuenciales para realizar HSCT.

Paso	Función
1	Identificar EAI severa potencialmente curable
2	Seleccionar el tipo de HSCT a realizar
3	Identificar la fuente de HSC
4	Tratamiento inmunosupresor
5	Transferir HSC
6	Manejo de complicaciones post-HSCT

Adaptado de ref. 5.

Tabla 5. Características del HSCT alogénico y autólogo.

Característica	Alogénico	Autólogo
Mortalidad relacionada al procedimiento	15 – 30%	~8%
Complicaciones postrasplante (incluye GVHD)	+++	+
Costos	+++	++
Reconstitución inmune	Lenta	Rápida
Duración de la remisión de la enfermedad	Mayor	Menor

HSCT alogénico o autólogo, los mejores resultados parecen lograrse cuando se elimina el mayor porcentaje de linfocitos autorreactivos. El HSCT alogénico ha logrado completa remisión de la EAI en un 90% de los casos reportados, en donde los pacientes fueron trasplantados por malignidad y presentaban de forma coexistente la EAI, éxito relacionado con la capacidad de alcanzar un completo quimerismo alogénico (3). Sin embargo, la alta mortalidad del procedimiento (15-30%), no la hace una aceptable de tratamiento para muchos pacientes con EAI, máxime si se trata de pacientes que no tienen ninguna malignidad asociada. La mortalidad relacionada al HSCT autólogo es considerablemente menor (~8%), lo que se constituye en su principal ventaja (3). Adicionalmente, ha logrado una mejoría significativa en los parámetros de evaluación clínica de cada enfermedad en la que se ha utilizado. Empero, la tasa de efectividad con este tipo de trasplante es menor cuando se compara con el HSCT alogénico y existe duda sobre de su efectividad a largo plazo.

En conclusión, se considera que el HSCT alogénico puede lograr un mayor porcentaje de respuesta favorable y remisiones clínicas más prolongadas, siendo el HSCT autólogo un procedimiento con buenos resultados y menor mortalidad relacionada al procedimiento, pero con una mayor tasa de recurrencia de la enfermedad.

A pesar de los entusiastas reportes iniciales, se debe tener en cuenta que el HSCT es un procedimiento que acarrea morbimortalidad significativa, así como potenciales complicaciones mayores a largo plazo que hasta el momento no se conocen completamente, ya que el seguimiento efectuado a los pacientes trasplantados ha sido relativamente corto. Por lo anterior, el papel del HSCT en el manejo de diversas entidades autoinmunes permanece controversial.

Identificación de candidatos para HSCT

El mayor conflicto al aplicar HSCT está en la selección del candidato idóneo para esta terapia. En condiciones ideales, la terapia con HSCT debe indicarse en pacientes con patologías que representen morbilidad significativa (incluyendo riesgo de muerte), que no han respondido a la terapia convencional y que se encuentren en estadios tempranos de la enfermedad, en los cuales aún se puede evitar el daño permanente de órganos blanco.

Infortunadamente, las EAI se caracterizan por tener un curso impredecible y por tanto sería ideal contar con marcadores específicos de laboratorio que junto con el análisis clínico, permitan identificar en forma precoz a pacientes con pobre pronóstico. El dilema para la elección del candidato resulta del parámetro de evaluación que se aplique. Por una parte, si el objetivo es prevenir el daño a órgano blanco, los candidatos ideales serían aquellos que aún se encuentren en fases tempranas de la enfermedad; o, por el contrario, si se evalúa bajo el parámetro de no respuesta a terapia convencional, los mejores candidatos serían aquellos en los cuales otras terapias ya han sido inefectivas, a pesar que seguramente en ese momento se encuentren en fases más avanzadas de la enfermedad, con compromiso de órgano blanco ya establecido. En 1996 se desarrolló el Primer Simposio Internacional en Terapia con Células Madre Hematopoyéticas en Enfermedades Autoinmunes (36), en donde se recomendó que los pacientes a considerar para HSCT son aquellos con enfermedades reumáticas específicas (Tabla 6), que no hayan respondido a terapias agresivas convencionales, con evidencia de compromiso orgánico severo que amenace la vida, y que al menos dos especialistas independientes indiquen el procedimiento.

Otro tópico de interés es la relación costo-beneficio, la cual puede ser analizada desde diferentes ángulos. Si bien los costos del HSCT son muy altos, en caso de lograrse la remisión completa de la enfermedad, podría incluso llegar a ser más económico, si se compara con el uso de terapias convencionales o biológicas, por tiempo prolongado. Sin embargo, estudios concretos que evalúen esta relación costo-beneficio, no se han realizado.

Con base en diferentes consensos internacionales, se ha formulado un cuestionario con principios para la selección individual de pacientes candidatos para HSCT (Tabla 7).

Es evidente que la actual recomendación favorece el HSCT en los pacientes más comprometidos, lo que afecta la respuesta clínica al procedimiento. Sin embargo, hasta

Tabla 6. Patologías reumáticas que podrían manejarse con HSCT según EULAR (European League Against Rheumatism) y EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation).

- Esclerosis múltiple
- Esclerosis sistémica (escleroderma)
- Lupus eritematoso sistémico
- Artritis reumatoide
- Dermatomiositis
- Vasculitis necrotizante
- Síndrome antifosfolípido
- Hipertensión pulmonar autoinmune
- Crioglobulinemia severa no controlada

Adaptado de ref. 36.

Tabla 7. Principios de selección individual de candidatos para HSCT.

1. Tiene el paciente una EAI definida con razonable predicción de su progresión clínica?
2. Existe evidencia que la enfermedad coloca en riesgo la vida del paciente?
3. Ha fallado el manejo con terapias convencionales agresivas?
4. Existe una base razonable que este modelo patológico pueda responder a una terapia inmunosupresiva a dosis altas?
5. Tiene el paciente compromiso importante de órgano mayor que aumente el riesgo inherente al procedimiento?
6. Se ha realizado una consideración real de los costos del procedimiento?
7. Está aprobado el procedimiento por el comité ético?

que los efectos adversos específicos, el margen de seguridad y efectividad del HSCT en cada patología autoinmune sean claramente establecidos, la aplicación de esta terapia en fase temprana de la enfermedad es aún prematura.

Resultados

La experiencia de HSCT en EAI crece día a día. Se han realizado HSCT en varias instituciones, con diferentes protocolos y patologías de base. De los casos reportados, los mayores grupos de pacientes están constituidos por EM y esclerosis sistémica (SSc) (33 y 28%, respectivamente).

El tipo de HSCT utilizado para el manejo de EAI ha sido en su mayoría el autólogo, debido a la menor morbimortalidad que representa. Hasta la fecha se han reportado a la base internacional de registro de la European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT), cerca de 500 HSCT autólogos, por tan sólo unos pocos HSCT alogénicos reportados en el manejo de EAI.

Si bien es difícil evaluar los resultados de HSCT, ya que todos los protocolos no están estandarizados, la tasa de mortalidad relacionada con HSCT a los 2 años es cercana al 8%, con evidencia de progresión de la enfermedad en el 22% durante este lapso, obteniendo algún grado de reducción de la actividad de la enfermedad en el restante 70% de pacientes.

Al examinar los resultados por patología específica, los efectos adversos se presentan con mayor frecuencia en pacientes con SSc respecto de otras patologías reumáticas (31).

Artritis reumatoide

A pesar de los nuevos tratamientos disponibles para la AR, existe un significativo número de pacientes que permanecen sin responder adecuadamente, por lo que se requiere el uso de nuevas terapias.

En el modelo murino MRL/lpr se ha demostrado que los sinoviocitos tipo A que rodean la sinovia reumatoide provienen de MO (37,38). En humanos, estas células son CD14+, lo que sugiere que también provienen de MO (39). En comparación a sujetos sanos, en los pacientes con AR se ha demostrado un incremento en el número de progenitores mieloides, así como un incremento de linfocitos B (LB) y monocitos CD14+, los cuales participan en el proceso destructivo articular (40).

Clínicamente, se han demostrado estas anormalidades *in vitro* cuando se movilizan células madre para el HSCT autólogo. Los pacientes con AR, al usar GCSF, tienden a movilizar un menor número de células madre y un mayor número de células CD14+, lo que pone en evidencia algún defecto en las células madre, asociadas a la sobreproducción concomitante de células del linaje monocito/macrófago (41). Esta evidencia, junto con la obtenida de modelos animales y humanos, hace al HSCT una atractiva opción de tratamiento en AR.

El HSCT autólogo se ha utilizado para el manejo de la AR severa, refractaria desde 1996. Hasta el momento se han reportado 76 casos de HSCT autólogo en AR (42,43), siempre en asocio con inmunosupresión a dosis altas, principalmente con CYC 200mg/kg. El tiempo promedio de seguimiento reportado fue de 16 meses, observándose en general una buena respuesta, con cerca de un 70% de pacientes alcanzando el criterio de respuesta ACR 50* en algún momento del seguimiento (especialmente pacientes con AR seronegativa, p=0.02). Aunque el procedimiento no es curativo, las manifestaciones persistentes o recurrentes de la enfermedad parecen controlarse con menos dificultad con el uso de fármacos modificadores (DMARD). Adicionalmente, no se han reportado casos fatales en relación directa con este procedimiento (44).

Hace poco en otro reporte (45), se describió con éxito el primer HSCT alogénico no mieloablativo realizado para el manejo de AR severa, a una mujer de 52 años, la cual alcanzó un quimerismo mixto (donante hermana) y que permanece en remisión de la enfermedad desde hace 12 meses, sin el uso de fármacos inmunosupresivos ni inmunomoduladores. Salvo la presencia de herpes zoster, no ha presentado ninguna complicación importante.

Está pendiente evaluar HSCT en aquellos pacientes que han fallado al manejo con agentes biológicos antifactor de necrosis tumoral alfa (TNF-α).

Lupus eritematoso sistémico

El LES es una EAI sistémica de severidad variable. En un determinado grupo de pacientes la enfermedad tiene un comportamiento especialmente severo y refractario a la terapia convencional, por lo que se requiere de nuevas terapias que mejoren el pronóstico de estos pacientes.

Existen reportes del uso de HSCT en LES. Estos pacientes recibieron HSCT alogénico indicado por aplasia medular concomitante, logrando remisión completa del LES (46). Adicionalmente, cada vez se encuentra un mayor número de reportes en donde se informa la efectividad de HSCT autólogo en el manejo de LES severo (47,48). Al igual que en otras patologías, la selección de pacientes con LES para HSCT es un tema controversial. El ACR propone incluir aquellos pacientes que han fallado a la terapia convencional y que cuentan al menos con uno de los siguientes criterios de inclusión (49):

1. Convulsión o psicosis lúpica.
2. Compromiso pulmonar definido por al menos 1 de 3 características:
   Hipertensión pulmonar; hemorragia pulmonar; o disminución en la capacidad vital forzada >15% en los últimos 6 meses.
3. Anemia hemolítica refractaria con reticulocitos >3% y hemoglobina < 10g/dL.
4. Índice de actividad del LES (SLEDAI) > 16.
5. Nefritis definida por al menos 1 de 3 características:
   Proteinuria > 1 g/día y albúmina < 3.0 g/dL; creatinina sérica > 1.5 y hematuria con cilindros celulares; o biop-

* ACR 20, 50 y 70 denota el porcentaje de mejoría clínica y paraclínica alcanzado en artritis reumatoide según el criterio del Colegio Americano de Reumatología

sia renal con lesiones proliferativas activas.
6. Recuento de plaquetas < 150.000 con MO normal o hipercelular.

Una serie de casos incluyó 15 pacientes (50), en los cuales se evaluó la eficacia y seguridad del HSCT autólogo en LES severo, refractario a terapias convencionales, incluyendo CYC endovenosa (EV). En esta serie los pacientes recibieron HSCT, en asocio a un régimen mieloablativo con CYC (200mg/kg), globulina antitimocito (90mg/kg) y metilprednisolona (3mg/kg). Los resultados fueron satisfactorios, encontrando una disminución significativa del índice de actividad del LES (SLEDAI) en el 80% de pacientes, hallando en sólo 2 pacientes recurrencia de la enfermedad luego de 1 año de seguimiento. El trasplante demostró ser seguro y permitió la suspensión de la medicación inmunosupresiva en la mayoría de los pacientes evaluados. No obstante, el tiempo de seguimiento permanece relativamente corto, por lo que todavía no se puede hablar de curación o remisión de la enfermedad a largo plazo (51).

Esclerosis sistémica

La SSc es una condición caracterizada por el depósito excesivo de colágeno en la piel y órganos internos, con el consecuente desarrollo de fibrosis. Existe considerable evidencia que soporta un rol patogénico para el proceso inflamatorio autoinmune que antecede al desarrollo de la fibrosis, particularmente en fases tempranas de la enfermedad (52). De este modo, se ha documentado la participación de linfocitos activados en la piel de pacientes con SSc, citotoxicidad dependiente de anticuerpos dirigida hacia el endotelio, proliferación de fibroblastos e inducción de la actividad de monocitos por el colágeno. Sin embargo, a diferencia de otras EAI, mediante el uso de fármacos inmunosupresores o inmunorreguladores, no se ha logrado una terapia verdaderamente efectiva en SSc. Por lo tanto, la terapia con HSCT surge como una alternativa importante para el manejo de SSc, en especial para aquellos pacientes que se encuentran en fases tempranas de la enfermedad (primeros 3-4 años), período en el cual el sistema inmune se encuentra más activo, siendo este un espacio lógico para la intervención terapéutica. En Estados Unidos y Europa se han reportado numerosos casos de SSc que han sido manejados con HSCT (53,54). Si bien analizar los resultados en un solo conjunto es difícil por la falta de protocolos estandarizados, se ha observado una mejoría entre el 65 y 87% de pacientes según el parámetro evaluado, entre ellos compromiso cutáneo, pulmonar, renal y calidad de vida. No obstante, en estas estadísticas se ha encontrado un porcentaje significativo de muertes relacionadas al procedimiento (~ 10%) y una minoría significativa de pacientes que no han mejorado y, otros que incluso han empeorado (~ 5%).

Con el objetivo de disminuir los resultados negativos de HSCT en SSc, se sugiere realizar una mejor selección de pacientes basado en esta experiencia preliminar. En el momento se encuentran en desarrollo ensayos clínicos controlados que servirán como guía para evaluar el papel más apropiado de HSCT en SSc.

Esclerosis múltiple

La EM es una patología relativamente frecuente, de carácter crónico, discapacitante, que afecta principalmente adultos jóvenes (55). Se presentan múltiples lesiones (placas) en el sistema nervioso central (SNC), caracterizadas por inflamación, desmielinización y gliosis. De igual manera, existe evidencia que compromete al sistema inmune en la patogénesis de la enfermedad y por tanto, la inmunomodulación ha sido pieza clave en su manejo. No obstante, no se ha encontrado ningún agente terapéutico que sea universalmente aceptado para el manejo integral de la enfermedad (56), ya que el uso de mitoxantrone, la mejor terapia disponible actualmente, se limita por el riesgo de toxicidad cardíaca (57). Debido a los hallazgos promisorios encontrados experimentalmente en modelos murinos de EAE y los resultados logrados en el manejo de otras EAI severas, el HSCT autólogo, ha sido postulado como una alternativa válida para el manejo de EM. Desde 1995, más de 200 pacientes con EM han sido manejados con HSCT autólogo en todo el mundo (58). Los resultados indican que el HSCT autólogo puede suprimir en forma completa y prolongada la actividad inflamatoria de la EM, valorada por resonancia nuclear. Clínicamente, parece tener un efecto benéfico al retrasar la progresión de la enfermedad, particularmente en pacientes que se encuentran con menos limitación funcional (59). La mortalidad relacionada al HSCT en promedio fue cercana al 5%, la cual podría disminuirse con la aplicación de criterios de selección de pacientes más estrictos. Finalmente, el rol de HSCT en EM está por determinarse y la mejor forma de hacerlo, es mediante un ensayo clínico controlado que compare directamente su eficacia, respecto a la mejor terapia disponible en el momento, el mitoxantrone.

Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM 1), es un proceso autoinmune caracterizado por la destrucción de las células beta de los islotes de Langerhans, productoras de insulina. Las complicaciones de la DM 1 están relacionadas al pobre control metabólico, siendo potencialmente devastadoras y ampliamente conocidas. Recientemente, se ha descrito la capacidad que las células madre poseen para "transdiferenciarse" en una variedad de linajes celulares diferentes (60,61). De aquí que exista gran interés en el potencial terapéutico que pueda lograrse mediante la transdiferenciación de células madre hacia células beta, con lo cual se podría producir de nuevo insulina (62-64). No obstante, este proceso no ha sido fácil y ha tenido varias dificultades principalmente por contaminación de HSC con precursores mesenquimatosos y por el fenómeno de fusión visto entre células madre y células titulares (65,66). Debido a limitaciones técnicas, el papel terapéutico de las células madre en DM 1 es controvertido en este momento; sin embargo, mediante un mayor conoci-

miento en las técnicas de manipulación, puede constituirse en una terapia que asegure resultados exitosos.

Finalmente, basado en los resultados alentadores logrados en EAI, las posibles indicaciones terapéuticas del HSCT van en aumento, con una serie de casos ya reportados en diversas EAI, como púrpura trombocitopénica autoinmune (67), granulomatosis de Wegener (68), miopatía inflamatoria (69), síndrome antifosfolípidico (70), poliradiculoneuropatía crónica desmielinizante inflamatoria (71), artropatía psoriática (72), enfermedad celíaca (73) y enfermedad de Behçet (74). Incluso en niños se ha evaluado con resultados satisfactorios en el manejo de artritis crónica juvenil (75), LES severo refractario (76), síndromes de sobreposición y vasculitis de pequeños vasos (77).

Complicaciones

Debido a la complejidad del HSCT, no es un procedimiento exento de riesgos. Las complicaciones infecciosas son unas de las más frecuentes. El citomegalovirus (CMV) puede producir un compromiso sistémico en receptores de HSCT autólogo o alogénico, por lo que tanto receptor como donante deben ser serotipificados para CMV antes del procedimiento. Si el receptor es seronegativo y el donante seropositivo, se debe iniciar profilaxis antiviral de acuerdo al protocolo establecido. Así mismo, el uso de antibióticos profilácticos para bacterias y hongos debe seguirse de acuerdo al protocolo local. El rechazo temprano del aloinjerto, es otra complicación que deber ser considerada en todos los individuos, ya que se observa con relativa frecuencia (~ 5%). Los regimenes que utilizan inmunosupresión menos intensiva, se relacionan con un mayor riesgo de presentar esta complicación.

La transferencia y proliferación de linfocitos del donante, en el receptor inmunocomprometido, produce una complicación potencialmente devastadora, conocida como GVHD aguda (78). Aunque su curso clínico es variable, es la responsable directa de cerca del 10% de la mortalidad postHSCT alogénico y otra serie de complicaciones postrasplante de severidad variable. Episodios más leves de GVHD, han sido también reportados en receptores de HSCT autólogo. Los órganos más frecuentemente comprometidos en GVHD aguda son la piel, el hígado y el tracto gastrointestinal. La GVHD crónica es otra importante complicación que puede presentarse hasta en el 50% de receptores de HSCT alogénico (79,80). Representa sustancial riesgo de infecciones subsecuentes y posee manifestaciones clínicas semejantes a patologías como LES, SSc y hepatitis autoinmune.

La inducción de EAI en el receptor (nueva), es otra importante complicación relacionada al HSCT, ya mencionada anteriormente.

El potencial de complicaciones a largo plazo no se conoce aún y se constituye en una de los mayores temores del HSCT. De estas posibles complicaciones, la pérdida de la capacidad reproductiva y el desarrollo de neoplasia (especialmente leucemia o linfoma), son ejemplos de algunas complicaciones a largo plazo ya descritas.

Sin la posibilidad de hacer predicciones individuales, existe un gran número de pacientes con EAI que presenta un curso particularmente severo, con compromiso multiorgánico y riesgo para la vida (81). El HSCT es un procedimiento que ha tomado un considerable ímpetu en el manejo de EAI en estos pacientes que no responden adecuadamente al manejo convencional. Los continuos reportes respecto a su efectividad, permiten considerar este procedimiento como una alternativa real en el manejo de EAI severas. Sin embargo, se trata de un procedimiento no exento de riesgo, que induce mejoría en una considerable proporción de pacientes, pero no en su totalidad, siendo el porcentaje de pacientes que alcanzan remisión completa de la enfermedad, aún menor. Por tanto, es necesaria la introducción de técnicas más seguras de HSCT, para disminuir la morbimortalidad relacionada con el procedimiento e incrementar su efectividad global (82). Al tiempo que nuevos estudios con diseños metodológicos más estrictos son publicados, algunos de los resultados publicados previamente son cuestionados. En el momento se encuentran en desarrollo ensayos controlados, útiles para determinar el papel preciso de HSCT en EAI.

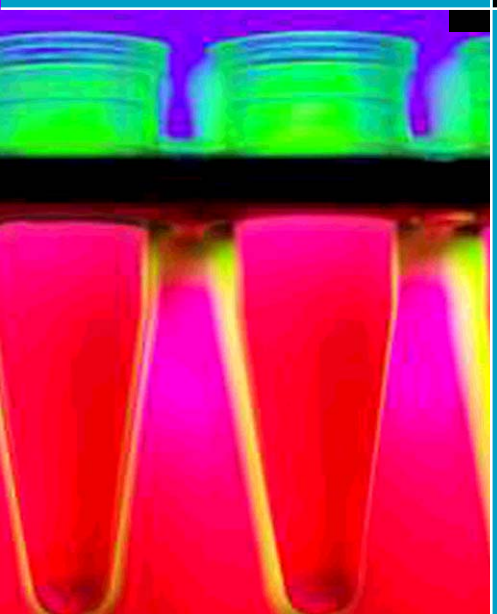
Referencias

1. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease Stem Cells Dev. 2004;13:463-72
2. Robert E, Quesenberry V, Peter J. Stem cell transplantation for reinduction of self-tolerance in autoimmune disease. Curr Opin Org Transplan 1999;4:197-201
3. Moore J, Tyndall A, Brooks P. Stem cells in the aetiopathogenesis and therapy of rheumatic disease. Best Pract Res Clin Rheumatol 2001;15:711-26
4. Gerald D. Fischbach, Ruth L. Fischbach. Stem cells: science, policy, and ethics. J Clin Invest 2004;114:1364–70
5. Koopman, McCarty. Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology. Bone marrow transplantation or hematopoietic stem cell transplantation. By Lea & Febiger publishers. 2000
6. Akizuki M, Reeves JP, Steinberg AD. Expression of autoimmunity by NZB/NZW marrow. Clin. Immunol Immunopathol 1978;10:247–50
7. Ikehara S, Kawamura M, Takao F, et al. Organ-specific and systemic autoimmune diseases originate from defects in hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 8341–44
8. Morton JL, Siegel BV. Transplantation of autoimmune potential. Development of antinuclear antibodies in H-2 histocompatible recipients of bone marrow from New Zealand Black mice. Proc Natl Acad Sci USA 1974;71:2162–66
9. Denman AW, Russel AS, Denman EJ. Adoptive transfer of the disease of New Zealand Black mice to normal mouse strains. Clin Exp Immunol 1969;5:567–70
10. Vinzio S, Lioure B, Grunenberger F, et al. Auto-immune-like disease post-bone marrow transplantation. Rev Med Interne 2004;25:514-23
11. Kishimoto Y, Yamamoto Y, Ito T, et al. Transfer of autoimmune thyroiditis and resolution of palmoplantar pustular psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transpla 1997;19:1041–3

12. Bargetzi MJ, Schonenberger A, Tichelli A, et al. Celiac disease transmitted by allogeneic non-T cell-depleted bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1997;20:607–9
13. Karthaus M, Gabrysiak T, Brabant G, et al. Immune thyroiditis after transplantation of allogeneic CD34+ selected peripheral blood cells. Bone Marrow Transplant 1997;20:697–9
14. Niederwieser D, Gentilini C, Hegenbart U. Transmission of donor illness by stem cell transplantation: should screening be different in older donors? Bone Marrow Transplant. 2004;34:657-65
15. Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1998;22:873–881
16. Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Prost AC, et al. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients. Transplantation 1988;46:238–40
17. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2001;7:473–85
18. Van Bekkum DW. Autologous stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. Stem Cells 1999;17:172–8
19. Knaan-Shanzer S, Houbew P, Kinwel-Bohre EP, et al. Remission induction of adjuvant arthritis in rats by total body irradiation and autologous bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1991; 8:333–8
20. Sturfelt G, Lenhoff S, Sallerfors B, et al. Transplantation with allogenic bone marrow from a donor with systemic lupus erythematosus (SLE): successful outcome in the recipient and induction of an SLE flare in the donor. Ann Rheum Dis 1996;55:638-41
21. Snowden J, Atkinson K, Kearney P, et al. Allogenic bone marrow transplantation from a donor with severe active rheumatoid arthritis not resulting in adoptive transfer of disease to recipient. Bone Marrow Transplant 1997;20:71-3
22. DW Van Bekkum. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases Bone Marrow Transplant 2003;32:S37–9
23. Viganego F, Furst DE. Bone marrow transplantation in the treatment of systemic sclerosis. Curr Rheum Reports 2000, 2:492–500
24. Pavletic SZ. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease. Arthritis Rheum 2004;50: 2387–90
25. Atkinson K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. Bone Marrow Transpla 1990;5:209–26
26. Ikehara S. Bone marrow transplantation for autoimmune diseases. Acta Haematol 1998;99:116–132
27. Gratwohl A, Tyndall A. From autoimmunity to stem cell transplantation. Crit Rev Oncol Hematol 1999;30:159–72
28. Euler HH, Schroeder JO, Harten P, et al. Treatment-free remission in severe systemic lupus erythematosus following synchronization of plasmapheresis with subsequent pulse cyclophosphamide. Arthritis Rheum 1994;37:1784–94
29. Reiner A, Gernsheimer T, Slichter SJ. Pulse cyclophosphamide therapy for refractory autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 1995;85:351–8
30. Wallace CA, Sherry DD. Trial of intravenous pulse cyclophosphamide and methylprednisolone in the treatment of severe systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1997;40:1852–5
31. Snowden JA, Biggs JC, Milliken ST, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilisation in patients with severe active rheumatoid arthritis. Bone Marrow Transplant 1998; 22:1035–41
32. Snowden JA, Brooks PM, Biggs JC. Haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. Br J Haematol 1997;99:9–22
33. Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. Bone Marrow Transplant 1995;16:413–25
34. Small TN, Avigan D, Dupont B, et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and post-transplant graft rejection prophylaxis. Biol Blood Marrow Transplant 1997;3:65–75
35. Cavenagh JD, Milne TM, Macey MG, et al. Thymic function in adults: evidence derived from immune recovery patterns following myeloablative chemotherapy and stem cell infusion. Br J Haematol 1997; 97:673–76
36. Tyndall A, Gratwohl A. Blood and marrow stem cell transplants in auto-immune disease: a consensus report written on behalf of the European League against Rheumatism (EULAR) and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant 1997;19:643–5
37. Henderson B, Revell PA, et al. Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact. Ann Rheum Dis 1988;47:348-9
38. Kitagawa H, Toki J, Inaba M, et al. Analyses of origin of synovial cells and repair in mechanisms of arthritis by allogenic bone marrow transplantation. Immunobiology 1993;188:99-112
39. Tomita T, Shimaoka Y, Kashiwagi N, et al. Enhanced expression of CD14 antigen on myeloid lineage cells derived from the bone marrow of patients with severe rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1997;24:465-9
40. Santiago SF, Sullivan C, Rappa D. Distinct alterations in lineage committed progenitor cells exist in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome. J Rheumatol 1996;23:439-46
41. Snowden J, Nink V, Cooley M, et al. Composition and function of peripheral blood stem and progenitor cell harvest from patients with severe active rheumatoid arthritis. Br J Haematol 1998;103:601-9
42. Kim KC, Lee IH, Choi HJ, et al. Autologous stem cell transplantation in the treatment of refractory rheumatoid arthritis. J Korean Med Sci 2002;17:129-32
43. Snowden JA, Passweg J, Moore JJ, et al. Autologous hemopoietic stem cell transplantation in severe rheumatoid arthritis: A Report from the EBMT and ABMTR. J Rheumatol 2004;31:482–8
44. Bingham SJ, Moore JJ. Stem cell transplantation for autoimmune disorders: Rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Haematol. 2004; 17:263-76
45. Burt RK, Oyama Y, Verda L, et al. Induction of remission of severe and refractory rheumatoid arthritis by allogeneic mixed chimerism. Arthritis Rheum 2004;50:2466–70
46. Gur-Lavi M. Long-term remission with allogenic bone marrow transplantation in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1999;42: 1777–8
47. Jayne D, Passweg J, Marmont A, et al. European Group for Blood and Marrow Transplantation; European League Against Rheumatism Registry. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. Lupus 2004;13:168-76
48. Brunner M, Greinix HT, Redlich K, et al. Autologous blood stem cell transplantation in refractory systemic lupus erythematosus with severe pulmonary impairment. A case report. Arthritis Rheum 2002; 46:1580-4
49. Furst DE. Stem cell transplantation for autoimmune disease: progress and problems. Curr Opin Rheumatol 2002,14:220–224
50. Traynor AE, Barr WG, Rosa RM, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus: analysis after five years and fifteen patients. Arthritis Rheum 2002;46:2917–23
51. Marmont AM. Hematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus. Arthritis Rheum 2003;48:2693–700
52. Viganego F, Furst DE: Bone marrow transplantation in the treatment of systemic sclerosis. Description of the rationale for SCT in SSC as well as the selection criteria. Curr Rheum Reports 2000;2:492–500
53. Furst DE, McSweeney P, Nash R, et al. One year outcome of autologous stem cell transplantation in 19 patients with severe SSC [abstract]. Arthritis Rheum 2001;44:S267
54. Binks M, Passweg JR, Furst D, et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease. Ann Rheum Dis 2001;60:577–584
55. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2002;359:1221– 31
56. Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon- beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS. Neurology 2001;56:1496–504
57. Hartung HP, Gonsette R. The MIMS-Study Group. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, randomized, observer- blind phase III trial: clinical results and three-year follow-up. Neurology 1999;52:A290
58. Fassas A, Kimiskidis VK. Autologous hemopoietic c stem cell transplantation in the treatment of multiple sclerosis: rationale and clinical experience. Journal of the Neurological Sciences 2004;223:53–8
59. Nash RA, Bowen JD, McSweeny PA, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. Blood 2003;102:2364–72.
60. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. BMJ 2002;325:372–6
61. Bretzel RM, Eckhard M, Brendel M, et al. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. Panminerva Med 2004;46:25-42
62. Efrat S. Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes. Isr Med Assoc J. 2004;6:265-7
63. Giannoukakis N, Trucco M. Current Status and Prospects for Gene

and Cell Therapeutics for Type 1 Diabetes Mellitus. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 2003;4:369–380
64. Creusot RJ, Fathman CG. Gene therapy for type 1 diabetes: a novel approach for targeted treatment of autoimmunity. J Clin Invest. 2004;114:892-4
65. McKay R. Stem cells—Hype and hope. Nature 2000;406:361–4.
66. Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL. Cell fate determination from stem cells. Gene Ther 2002;9:606–12
67. Lisukov I, Sizikova S Kulagin A, et al. High dose melphalan with ítem cell support for the refractory immune thrombocytopenic purpura (ITP): a case report. Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
68. Bornhäuser M, Paul KD, Gahr M. CD34 positive selection of cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) for a patient with Wegener´s granulomatosis. Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
69. Grau JM, Laguno M, Perea M. Stem cell treatment in inflammatory mypathies. Proposal for patient selection. Ann Rheum Dis 2001; 60:708–16
70. Hashimoto N, Iwasaki T, Sekiguchi M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for refractory antiphospholipid syndrome causing myocardial necrosis. Bone Marrow Transplant. 2004;33:863-6
71. Ciceri F, Magnani G, Zappone E, et al. Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) with high dose immunosuppressive treatment using cyclophosphamide autologous haemopoietic stem cell rescue. Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
72. Mohren A, Amberger C, Daikeler T, et al. Autologous stem cell transplantation in a patient with psoriatic arthropathy. Ann Rheum Dis 2001; 60:708–16
73. Rohrlich P, Legrand F, Faye A, et al. Unrelated allogenic stem cell transplantation in an infant with severe autoimmune pancytopenia associated with celiac disease: a case report. Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
74. Hensel M, Schlenk RF, Fiehn C, et al. Successful high dose chemotherapy (HDC) with autologous haemopoietic stem cell transplantation (SCT) in two patients with Behcet´s disease and pulmonary involvement. Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
75. Zintl F, Köhler A, Müller A, et al. Autologous stem cell transplantation (ASCT) in children with progressive systemic juvenile chronic arthritis (JCA). Ann Rheum Dis 2001;60:708–16
76. Chen J, Gu LJ, Zhao HJ, et al. Application of CD34+ autologous peripheral progenitor cell transplant in the treatment of children with refractory SLE. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2003;41:426-9
77. Jones OY, Good RA, Cahill RA. Nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplantation for treatment of childhood overlap syndrome and small vessel vasculitis. Bone Marrow Transplant 2004;33:1061-3
78. Antón JH. Long term care after hematopoietic cell transplantation in adults. N Engl J Med 2002;347:36-42.
79. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. Blood 1981;57:267-76
80. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am J Med 1980;69:204-17
81. Machold K, Smolen J. Stem cell transplantation: limits and hopes. Ann Rheum Dis 2001;60:545–9
82. Brenner MK. Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease: limits and future potential. Best Pract Res Clin Haematol 2004;17:359-74

SECCIÓN V

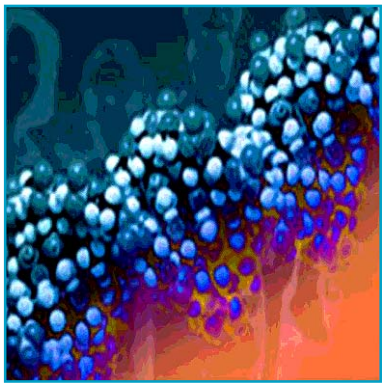


Principios Básicos de Laboratorio

39

PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA GENÓMICO

John Castiblanco
Paula A. Correa



Contenido

Generalidades
Lisis Celular
Preparación de DNA de alto peso molecular mediante proteinasa K y fenol
Preparación de DNA de alto peso molecular por precipitación salina diferencial
Conservación del material genético
Fraccionamiento de los ácidos nucléicos
- Centrifugación zonal
- Centrifugación isopícnica o de equilibrio de sedimentación
- Electroforesis

El análisis y la aplicación de las diferentes técnicas básicas de biología molecular dependen de la habilidad para obtener DNA de alto peso molecular puro. Habitualmente, los protocolos de preparación y obtención de DNA comprenden dos partes: una lisis celular inicial, seguida por uno o varios métodos químicos o enzimáticos que precipitan y remueven proteínas, RNA y otras macromoléculas contaminantes en el proceso de extracción. El DNA, dada su complejidad a nivel molecular, es difícil de separar del resto de estos componentes celulares (membrana, proteínas, etc.). Por otro lado, los métodos drásticos de separación alteran su estructura y características; de ahí que han sido desarrollados métodos sencillos con el ánimo de eliminar impurezas, basados en las propiedades de los ácidos nucléicos. En este capítulo se considerarán algunas formas de separar, precipitar, conservar y fraccionar DNA genómico.

Generalidades

La aplicación de las diferentes técnicas de biología molecular en el análisis de genomas complejos depende de la habilidad para preparar DNA de alto peso molecular puro. Generalmente, los protocolos de preparación y obtención de DNA comprenden dos partes: una lisis celular inicial, seguida por uno o varios métodos químicos o enzimáticos que precipitan y remueven proteínas, RNA y otras macromoléculas.

El DNA de cadena doble es químicamente inerte. Sus grupos reactivos potenciales se encuentran dentro de su hélice central, formando los enlaces de hidrógeno que sostienen el esqueleto de la misma. Sus bases nitrogenadas están protegidas por un formidable soporte compuesto por fosfatos y azúcares que son reforzados internamente por fuertes enlaces covalentes moleculares. Con tal conformación el DNA es más duradero que otros componentes intracelulares.

A pesar de su estabilidad química, el DNA de doble cadena, no obstante, es físicamente frágil. Largo y enmarañado, con poca estabilidad lateral, el DNA de alto peso molecular es vulnerable a fuerzas hidrodinámicas. En solución la molécula se comporta como un espiral aleatorio que es endurecido por la acumulación de interacciones entre las pares de bases y la repulsión electrostática entre los grupos fosfato cargados en el armazón de la molécula. El flujo hidrodinámico -resultante de manipulación y la agitación- genera arrastre en la molécula plegada que tiene la capacidad de desprender y romper la molécula. Entre más larga sea la molécula menor la fuerza necesaria para romperla. Así, el DNA genómico es relativamente fácil de obtener en una forma fragmentada pero es progresivamente más difícil su obtención a medida que su peso molecular se incrementa; las moléculas de DNA por encima de las 150 kb (kilobases) son propensas a fragmentarse por fuerzas generadas durante los procedimientos comúnmente usados para su obtención.

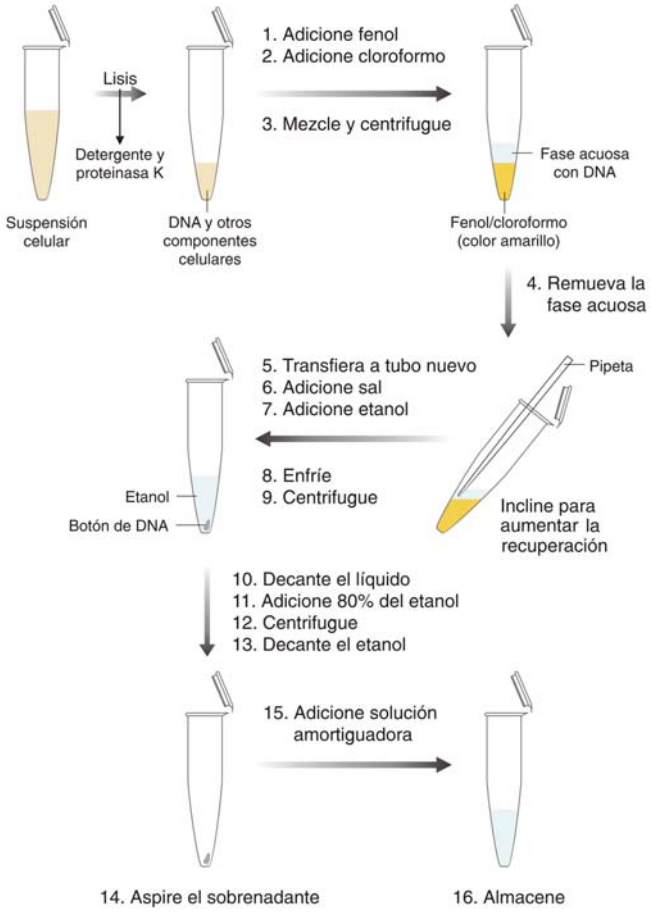


FIGURA 1.
Procedimiento de obtención de DNA

Lisis celular

Por lo general, la lisis celular se realiza en un medio hipertónico, puede ser aplicada tanto a células en suspensión como a células adheridas a placas de cultivo. En la preparación de células sanguíneas es frecuente la aplicación de reactivos de lisis diferencial. Para el recuento y estudio de leucocitos se lisan los eritrocitos con un medio ácido o en una solución de cloruro de magnesio.

Debido a que generalmente los tejidos o muestras celulares (ver Separación y Cultivo Celular) contienen enorme cantidad de debris (matriz extracelular), a menudo es complicada la obtención del DNA con alta eficiencia. Ésta se puede aumentar si el tejido es reducido mediante medios mecánicos o enzimáticos antes de llevar a cabo una homogenización en la solución amortiguadora de lisis. Posterior a la lisis celular, el lisado puede ser sometido a tratamientos que prevengan la destrucción del DNA y eliminen moléculas aún presentes (Figura 1).

Preparación de DNA de alto peso molecular mediante proteinasa K y fenol

Este procedimiento fue originalmente derivado de un método descrito por Darryl Stafford y sus colegas en 1976. El método comprende la digestión de la suspensión celular o tejido de la fuente de la cual se desea extraer el material genético con proteinasa K en presencia de EDTA (ácido tetra-etilendiamino acético; quela cationes divalentes e inhibe la acción de las DNasas) y el tratamiento con detergentes no iónicos (SDS, Sodio Duodecyl Sulfato) para la solubilización de membranas y la denaturación de proteínas. Los ácidos nucléicos son posteriormente precipitados mediante etapas de extracción con solventes orgánicos. El RNA contaminante es eliminado mediante la digestión con RNasa. Este método puede ser llevado a gran escala para obtener gran cantidad de DNA. Sin embargo, fuerzas de rompimiento son generadas en cada paso de la extracción, con el resultado de moléculas de DNA en la preparación final que raramente exceden de 100 - 150 kb de largo. Las moléculas de DNA de este tamaño son adecuadas para: análisis de electroforesis, como molde para técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para la construcción de librerías genómicas en vectores específicos (Figura 1).

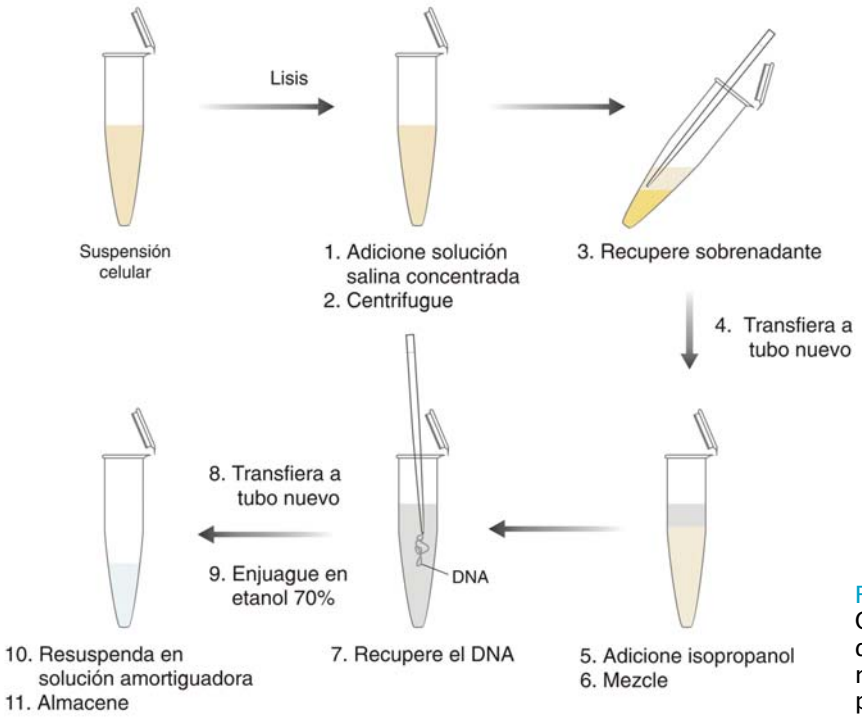


FIGURA 2.
Obtención y purificación de ácidos nucleicos mediante precipitación por sales.

Preparación de DNA de alto peso molecular por precipitación salina diferencial

Se trata de un procedimiento basado en las diferencias de solubilidad del DNA y el RNA en función de la concentración de sales. Tanto el DNA como el RNA son solubles en solución salina concentrada, mientras que a baja concentración salina sólo es soluble el RNA. Para esta precipitación salina se suele utilizar NaCl, pero también puede ser utilizado acetato sódico ($CH_3COONa\ 3H_2O$), en combinación con alcoholes orgánicos, conduciendo a resultados incluso mejores que con otros disolventes orgánicos (Figura 2).

Conservación del material genético

Luego de la obtención del DNA éste debe ser almacenado adecuadamente. El precipitado obtenido de la preparación puede ser disuelto en solución amortiguadora (normalmente TE [Tris- EDTA]) y para análisis posteriores conservarse a 4°C. Para almacenar el DNA que no va a ser manipulado en un tiempo determinado es conveniente su congelación a -20°C.

Por otro lado, cada vez es más frecuente y eficaz la extracción directa de DNA con métodos más específicos, fáciles y rápidos de realizar y procesar. No se requiere la manipulación previa de las muestras, con lo que el DNA puede ser extraído en forma directa a partir de muestras heterogéneas y de pequeño volumen.

Fraccionamiento de los ácidos nucléicos

Virtualmente, todos los protocolos de biología molecular requieren, en algún punto, del fraccionamiento de ácidos nucléicos. A continuación se describen los procesos que regularmente son utilizados para la separación y caracterización de DNA dependiendo de sus propiedades químicas y físicas.

Centrifugación zonal

De forma similar a lo propuesto para separación celular (Figura 3) (Capítulo 40), se puede emplear esta modalidad de centrifugación sobre gradientes de densidad para separar moléculas de ácidos nucléicos, en función de su velocidad de sedimentación. Las moléculas de ácido nucléico se sedimentan a una velocidad constante, con lo que se sitúan en bandas, cuya posición depende del tamaño y la forma de la molécula. Éstas se pueden recoger separadas en fracciones y cuantificarse midiendo su absorción a 260nm.

Centrifugación isopícnica o de equilibrio de sedimentación

Es quizá el método más utilizado para la separación de distintos tipos de ácido nucléico, en especial DNA. En este caso las moléculas se separan en función de su densidad, generalmente usando un gradiente que se va formando durante la centrifugación a la vez que se separan los componentes de la muestra. El medio que más se utiliza para el gradiente es una solución de cloruro de cesio (CsCl), el cual, gracias a su alta solubilidad y baja viscosidad, permite formar gradientes de un amplio margen de densidad. La muestra se mezcla con la solución de CsCl y se procede a la centrifugación hasta alcanzarse el equilibrio de sedimentación. Cada tipo de ácido nucléico se sitúa formando una banda, en aquella posición del gradiente donde la densidad del medio iguala a la de la molécula.

Electroforesis

Esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con una velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de DNA poseen un pH alcalino habitual y una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad hacia el ánodo (+) sea determinada por el tamaño de la molécula (Tabla 1).

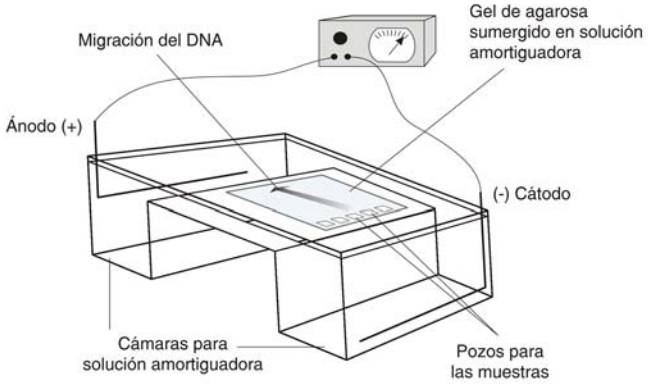
La separación de los fragmentos de DNA se realiza por electroforesis en geles de agarosa (generalmente horizontales) o poliacrilamida (generalmente verticales). En ambos casos el gel se prepara en distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos de DNA que quieren ser separados (Figura 3). Modificando la concentración de la acrilamida o agarosa se consigue una mayor resolución en cuanto al intervalo de tamaños posibles de separación.

Tabla 1. Resolución de electroforesis

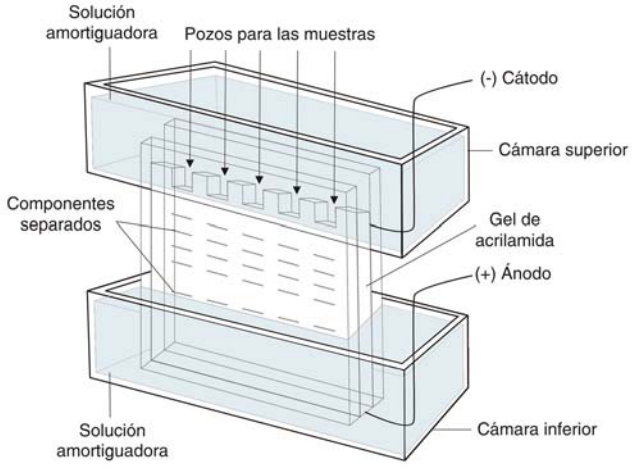
Composición del gel		Rangos de resolución
% de acrilamida	% de agarosa	de DNA (kb)
20		0,006 – 0,1
15		0,025 – 0,15
12		0,04 – 0,2
8		0,06 – 0,4
5		0,08 – 0,5
3,5		1 – 2
	2	0,1 – 2
	1,5	0,2 – 3
	1,2	0,4 – 6
	0,9	0,5 – 7
	0,7	0,8 – 10
	0,6	1 – 20
	0,3	5 – 60

Figura 3.
Electroforesis.

a.



b.



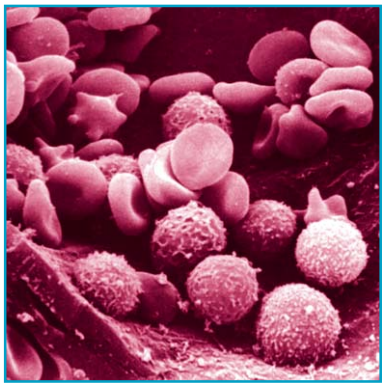
Lecturas recomendadas

1. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Preparation and Analysis of Eukariotic Genomic DNA. In: Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 1982: 6.1–6.62
2. Moore DD, Strauss WM. Preparation and analysis of DNA. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Smith JA, Seidman JC, Struhl K, editors. Current protocols in molecular biology. Virginia Benson Chanda. John Wiley and Sons, Inc. 1998. 141–161
3. Davis L, Kuehl M, Battey J. Preparation of genomic DNA. In: Davis L, Kuehl M, Battey J, editors. Basic methods in: Molecular Biology. Second edition. Prentice Hall. Englewood cliffs, New Yersey. 1994: 305–314
4. Reed R, Holmes D, Weyers J, et al. Handling cells and tissues. In: Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A, editors. Practical skills in Biomolecular Sciences. London, Longman Limited, 2000: 59–87
5. Luque José, Herraéz A. Preparación de muestras, extracción y separación de ácidos nucléicos. En: Luque José, Herraéz A. En: Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ediciones Harcourt S.A. Madrid, España. 2001: 117–136

40

SEPARACIÓN Y CULTIVO CELULAR

John Castiblanco
Paula A. Correa



Contenido

Desarrollo del cultivo celular
Aplicaciones del cultivo celular
Sistemas de cultivo de células animales
Ventajas y desventajas del cultivo celular
Principales tipos de cultivo celular
Preparación preliminar y tipos de muestra
Métodos de separación celular
- Separación de células por métodos de sedimentación y centrifugación
- Caracterización y separación de células por citometría de flujo
- Separaciones por afinidad con partículas magnéticas

Conteo y viabilidad celular

El cultivo celular in vitro *es un método usado para estudiar el comportamiento de las células animales en un ambiente controlado, libre de variaciones sistémicas. Al presente, los diferentes modelos de estudio de cultivo celular han sido adaptados y en ciertas ocasiones desarrollados a medida que la investigación básica y médica avanzan en el conocimiento y adquisición de nuevas formas de aplicación. A continuación se presenta un breve recuento de las principales características, tipos, requerimientos y aplicaciones que han decidido el avance del cultivo celular. Posteriormente, se describen diferentes acercamientos para tener en cuenta en la separación celular, involucrando desde las técnicas básicas hasta las más contemporáneas, describiendo sus diferentes aplicaciones y principios fundamentales.*

Desarrollo del cultivo celular

El cultivo celular fue desarrollado a comienzos del siglo XX como un método para estudiar el comportamiento de las células animales en un ambiente libre de variaciones sistémicas que pueden ser encontradas en el animal durante su homeóstasis normal y stress de un experimento.

El primer modelo celular escogido para el cultivo fueron células de anfibios, presumiblemente por ser animales exotermos y no ser necesaria una sucesiva incubación. Más adelante, el estímulo de las ciencias médicas llevó a interesarse en animales endotermos, donde el desarrollo normal y patológico es similar al de los humanos.

El acceso a diferentes tipos de tejidos, muchos de los cuales crecían bien en cultivo, hizo del embrión de gallina la opción favorita, para estudios *in vitro*. Adicionalmente, con el desarrollo de cepas genéticamente puras de roedores, trajo a los mamíferos al frente del trabajo en investigación. Mientras que los embriones proveían una amplia gama de tipos celulares en cultivo primario, los roedores tenían la ventaja de líneas celulares continuas y un considerable repertorio de células tumorales.

El perfeccionamiento del cultivo celular como una técnica moderna y sofisticada se basa, en su mayoría, en las necesidades de dos ramas médicas principales: la virología y la oncología. El cultivo celular también ha sido acogido dentro de muchas aplicaciones de rutina en medicina e industria. El análisis cromosómico de células derivadas del útero obtenidas por amniocentesis puede revelar desórdenes genéticos en el feto; asimismo, infecciones virales pueden ser evaluadas cuantitativamente y cualitativamente en células del huésped, y los efectos tóxicos de compuestos farmacéuticos y posibles contaminantes pueden ser evaluados por formación de colonias u otros ensayos *in vitro*.

In vivo
Que ocurre dentro de un organismo vivo (en vida).

In vitro
Que ocurre afuera de un organismo vivo en un ambiente artificial y controlado.

Aplicaciones del cultivo celular

Los principales usos de los sistemas de cultivo celular comprenden:

Sistemas de modelo experimental en ciencias básicas y médicas: El cultivo celular ofrece ciertas ventajas sobre las condiciones ambientales y la variabilidad biológica. El uso de clones genéticamente definidos y caracterizados puede simplificar el análisis de datos experimentales. En contraste, los resultados obtenidos con sistemas celulares específicos no podrían ser representativos de un amplio rango de tipos celulares.

Estudio de requerimientos fisiológicos para ciertos tipos celulares: Incluyendo estudios de efectos positivos de factores de crecimiento, sustancias promotoras de crecimiento, efectos negativos de sustancias xenobióticas o compuestos citotóxicos y eventos relacionados con la muerte celular programada (apoptosis).

Estudios de desarrollo y diferenciación celular: Incluyendo aspectos del ciclo celular y la expresión génica.

Estudios patológicos: Encierran la caracterización de células por medio de cariotipificación para determinar su estado genético.

Manipulación genética: Las técnicas de cultivo celular han jugado un papel esencial en el desarrollo de la biología molecular, mediante el desarrollo de procedimientos tales como la transfección.

Biotecnología: Mediante la producción industrial de proteínas terapéuticas, vacunas y anticuerpos monoclonales.

Sistemas de cultivo de células animales

Los sistemas celulares pueden ser establecidos a partir de organismos completos (embriones de gallina), órganos discretos (hígado de ratón), o sangre (linfocitos). Mientras, en la teoría, es posible cultivar células nucleadas de cualquier fuente, en la práctica, la más alta probabilidad de éxito es alcanzada con células jóvenes y activas. Unas de las principales consideraciones para el desarrollo del cultivo celular son las siguientes:

Bioseguridad: Es importante ser consciente de los riesgos potenciales de infección en el cultivo de células animales. Aunque las células animales presentan un riesgo reducido de transmisión de enfermedades comparado con células humanas, los cultivos y las células deben ser siempre manejados como fuente potencial de microorganismos patógenos.

Uso de cultivo primario o líneas celulares continuas: Las células recientemente aisladas reflejan más fácilmente las actividades bioquímicas de las células *in vivo,* aunque éstas tendrán un tiempo de vida limitado. Las líneas celulares continuas son de fácil manejo y ofrecen la ventaja los requerimientos de crecimiento que pueden ser conocidos.

Cultivo primario
Cultivo celular derivado de fragmentos de tejido. Generalmente termina en el primer subcultivo.

Subcultivo (pase)
Término para determinar el cambio de células de un frasco de cultivo a uno nuevo. Recambio de medio de cultivo.

Línea celular continua
Cultivo celular con capacidad ilimitada de multiplicación *in vitro.*

Línea celular finita
Cultivo con limitada capacidad de crecimiento *in vitro.*

Clon
Población de células derivadas de una misma, que presentan el mismo fenotipo.

Senescencia
Punto final en el ciclo biológico de una línea celular finita, caracterizado por la ausencia de división. La conversión de una línea celular finita a una continua requiere sobrepasar la senescencia.

Requerimientos del medio de cultivo: Éstos incluyen la provisión de iones inorgánicos (como una solución de sales balanceada), una fuente de carbono, más otros nutrientes orgánicos y suplementos que incluyen agentes antimicrobianos para contrarrestar los riesgos de contaminación. Como soporte del crecimiento, el medio basal es usualmente suplementado con suero (suero fetal bovino) o un suplemento homólogo al suero con una composición establecida con una mezcla de proteínas, polipéptidos, hormonas, lípidos y elementos traza. Los niveles de CO_2 y O_2 deben ser considerados; muchos cultivos son amortiguados con bicarbonato y deben ser mantenidos en una atmósfera con alto contenido de CO_2.

Ventajas y desventajas del cultivo celular

Es claro que el estudio de la actividad celular *in vitro* posee muchas ventajas, pero al mismo tiempo se deben tener muy en cuenta sus desventajas. Las dos ventajas principales son el control del ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno, y la tensión de dióxido de carbono) el cual puede ser controlado con mucha precisión; y la segunda ventaja es el control de las condiciones fisiológicas, las cuales pueden ser examinadas constantemente.

La composición de los tejidos es variable y heterogénea. Réplicas de una misma muestra pueden presentar diversos constituyentes. Después de pases seriados, las líneas celulares se asumen homogéneas o al menos uniformes en su constitución, son mezcladas al azar en cada transferencia y la presión selectiva de las condiciones de cultivo tienden a producir un fenotipo óptimo prevalente.

Dentro de las desventajas del cultivo celular se encuentran: la experiencia, las técnicas deben ser llevadas a cabo en estricta asepsia, debido a que las células animales crecen más lento que muchos de los contaminantes comunes (bacterias, hongos y levaduras). Así mismo, las células animales no pueden existir aisladas y por consiguiente no son capaces de sostener una existencia independiente sin que se les provea de un ambiente complejo. Una de las principales limitaciones del cultivo es el gasto y el esfuerzo que se le aplica a la obtención de relativamente poco contenido celular.

Principales tipos de cultivo celular

Hay tres tipos principales de iniciación de cultivos celulares (Figura 1):

1. *Cultivo de tejidos.* El cual implica que la arquitectura característica del tejido es retenida, por lo menos en

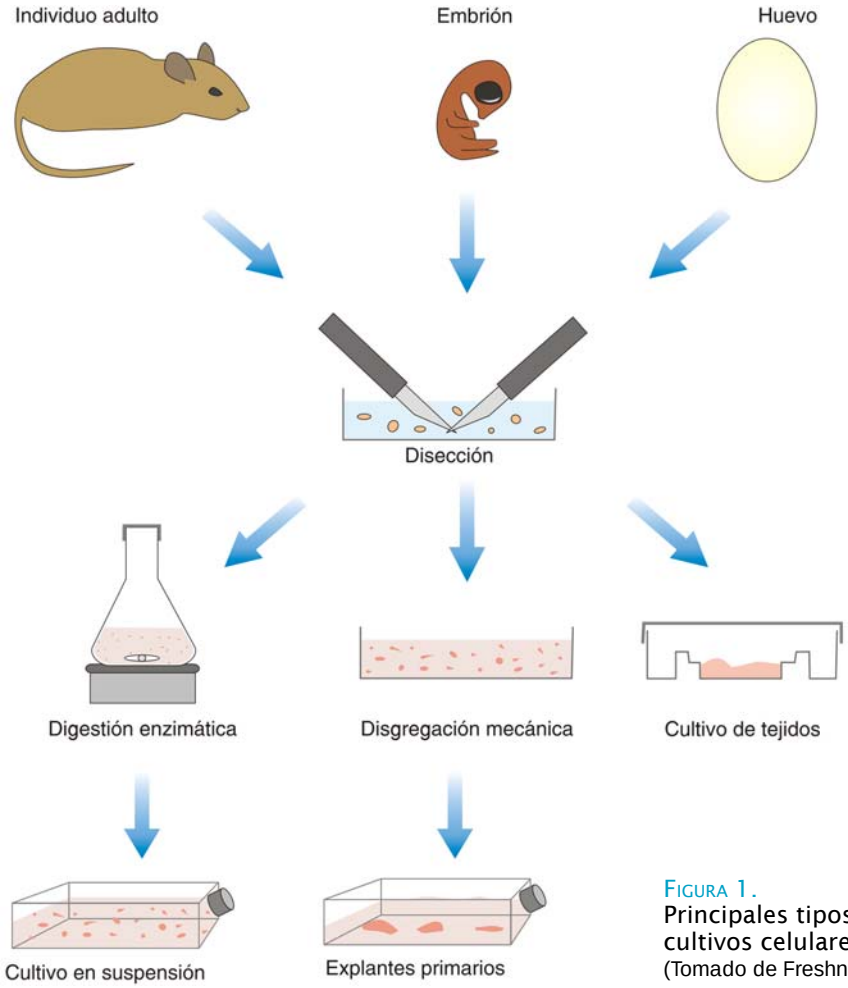


FIGURA 1.
Principales tipos de iniciación de cultivos celulares.
(Tomado de Freshney RI, 1994)

parte en el cultivo; este tipo de cultivo es de crecimiento lento y se restringe regularmente a tejido embrionario y a la periferia del mismo.

2. *Explante primario.* El tejido es expuesto en una interfase sólido-líquida, donde luego de adherirse, se observa migración de las células a través de la fase sólida.
3. *Cultivos primarios y/o continuos.* Son derivados directamente de tejido animal normal obtenido y cultivado como explante o por disociación, ya sea física o enzimática en cultivo de células en suspensión.

Los cultivos continuos implican una clase específica de tipo celular (línea celular) que puede ser indefinidamente propagada en cultivo por un número ilimitado de divisiones celulares (aproximadamente 30). Las líneas celulares de viabilidad finita son usualmente diploides y mantienen cierto grado de diferenciación. El hecho de que estas líneas senescan después de casi treinta ciclos de división hace esencial establecer un sistema de bancos celulares con el fin de mantener estas líneas por largos períodos de tiempo.

Las líneas celulares que pueden ser propagadas indefinidamente, generalmente tienen esta habilidad porque han sido transformadas en células tumorales. Las líneas tumorales celulares con frecuencia son derivadas de tumores de pacientes clínicos; simultáneamente la transformación puede ser inducida por medio de virus o por tratamientos químicos. Estas líneas transformadas presentan la ventaja de una disponibilidad casi ilimitada pero, al mismo tiempo, presentan la desventaja de no retener en su totalidad sus características iniciales.

Preparación preliminar y tipos de muestra

Las muestras celulares se obtienen y preparan a partir de órganos, tejidos y fluidos biológicos, en función del objetivo, del tipo de célula, tipo de material genético, y tipo de análisis por realizar (Tabla 1). En todos los casos se deben seguir procesos que aseguren la calidad de la muestra. Generalmente, la preparación se hace tras la obtención de la muestra, sin embargo, si esto no es posible deben brindarse las condiciones necesarias para que la muestra no sufra degradación.

El éxito de cada técnica depende de la adecuada obtención, procesamiento, preservación y recuperación de la muestra. Las normas generales para la obtención y almacenamiento de las muestras deben anticipar los requerimientos de estudios futuros.

Métodos de separación celular

Mientras que las condiciones selectivas de cultivo son las preferidas para la obtención de un tipo celular específico, existen ocasiones en las cuales el tipo celular requerido no presenta una eficiencia tal que permita una recuperación apropiada. Es entonces necesario recurrir a técnicas de separación tales como sedimentación por densidad y/o citometría de flujo. Las técnicas de separación celular tienen la ventaja de permitir una alta producción y recuperación celular en un tiempo menor.

Las técnicas de separación celular de mayor rendimiento dependen de diferencias en: 1. tamaño celular; 2. densidad celular (gravimetría específica); 3. carga celular; 4. química de la superficie celular; 5. complejidad celular y 6. emisión de fluorescencia de dos o más constituyentes celulares o de un anticuerpo adsorbido.

Para la obtención de muestras celulares adecuadas para análisis de laboratorio se requieren varios procedimientos en los cuales se implica la separación, el fraccionamiento y caracterización, que están basados normalmente en las propiedades de cada tipo celular existente en la muestra. La elección de cada protocolo depende del grado deseado de separación, conservación de la viabilidad, los análisis y técnicas para aplicar sucesivamente.

TABLA 1. Algunos tipos de muestra y algunas de sus aplicaciones.

Tipo de muestra	Tipo Celular	Análisis
Tejidos sólidos	Tumoral	Marcadores de membrana, de citoplasma y de núcleo
	Hepático	Enfermedades metabólicas
	Muscular	Enzimopatías
	Intestinal	Enzimopatías
	Hueso	Pulpa de dientes o médula de otros huesos
Suspensiones celulares	Células embrionarias	Células pluripotentes, elevado interés en trasplantes
	Líquido amniótico	Amniocentesis. Diagnóstico prenatal
	Sangre o médula ósea	Diagnóstico prenatal. Observaciones citológicas, estudios genéticos e histológicos
	Muestras bucales	Obtención de DNA
	Semen	Marcadores de fertilidad, investigación forense
	Células en cultivo	Líneas celulares caracterizadas
Líquidos biológicos extravasculares	Cefalorraquídeo	Punción lumbar. Detección de enfermedades del sistema nervioso y algunos marcadores tumorales
	Líquido articular o sinovial	Artrocentesis. Procesos mecánicos e inflamatorios patológicos

Separación de células por métodos de sedimentación y centrifugación

Al realizarse en un medio líquido la centrifugación no sólo depende de la fuerza centrífuga, sino de otros factores que modifican la sedimentación y que dependen de las características celulares. Las dos variables definen la velocidad de sedimentación de la célula.

Centrifugación diferencial

Normalmente el más sencillo, en la práctica sólo pueden ser separadas células que muestren grandes diferencias de tamaño (al menos 10 veces). En el caso de la sangre con anticoagulante, a 200g (g=gravedades) los eritrocitos sedimentan en la zona inferior, los leucocitos aparecen en la interfase y queda como sobrenadante un plasma rico en plaquetas. Se puede obtener un plasma pobre en plaquetas empleando mayor velocidad (3.000g) (Figura 2).

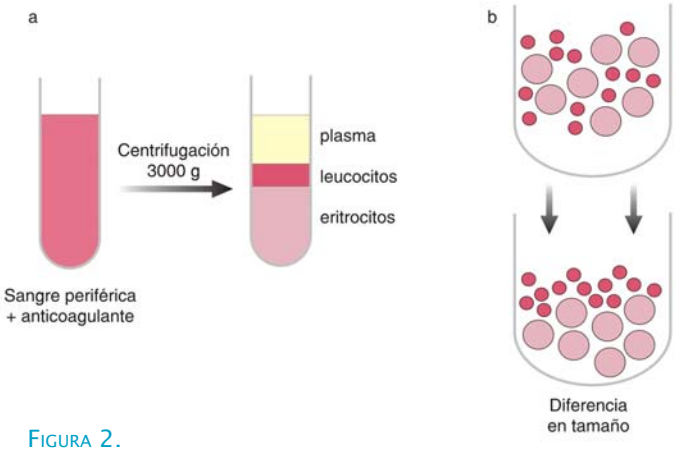


FIGURA 2.
Centrifugación diferencial.
Separación en función del tamaño y a su vez del coeficiente de sedimentación, el cual es dependiente de la masa. a. separación de sangre periférica 3.000g. b. Centrifugación diferencial por tamaño.

Centrifugación en gradiente de densidad

Métodos de barrera (centrifugación a través de un medio de centrifugación constante)

Para conseguir separaciones más eficaces se centrifuga la muestra sobre un lecho de densidad intermedia entre la de los dos tipos celulares que se quieren separar.

Utilizando Ficoll-Hypaque, el cual tiene una densidad de 1.077 g/mL, que es idéntica a la de linfocitos y monocitos, es posible recuperar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells). El Ficoll-Hypaque es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular (Ficoll) y un compuesto orgánico iodinatado (diatrizoato de sodio: 3-5 bis acetilamino-2, 4, 6 ácido triyodobenzoico). Los granulocitos y eritrocitos poseen una mayor densidad y cuando se centrifuga la sangre periférica en el gradiente de Ficoll-Hypaque, pasan a través de éste formando un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas tienen una densidad menor y permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interfase (Figura 3).

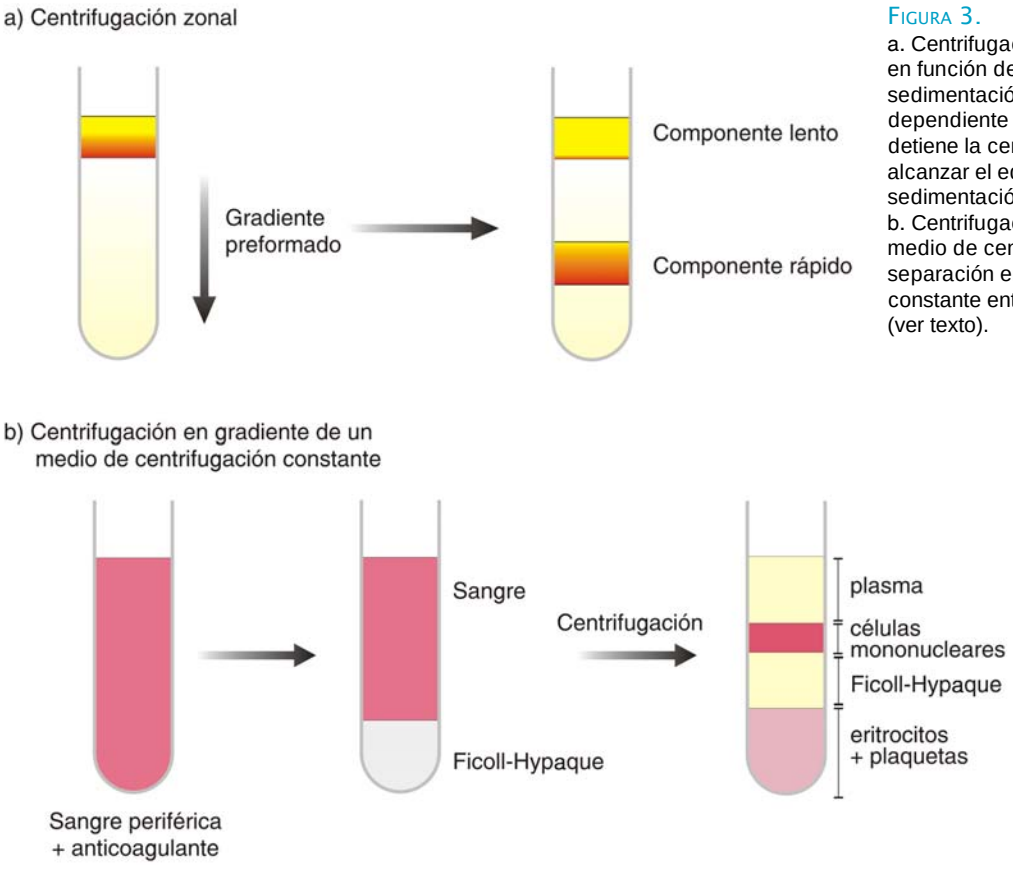


FIGURA 3.
a. Centrifugación zonal, separación en función del coeficiente de sedimentación, el cual es dependiente de la masa y forma. Se detiene la centrifugación antes de alcanzar el equilibrio de sedimentación.
b. Centrifugación en gradiente de un medio de centrifugación constante, separación en un medio de densidad constante entre los dos tipos celulares (ver texto).

También existen otras soluciones para la separación de células mononucleares utilizando gradientes de densidad entre los cuales uno muy efectivo, es el Percoll. Para la separación de células mononucleares es más común emplear soluciones comerciales como el Lymphoprep, Lymphopure e Hystopaque. Se dispone de varios medios con densidades adecuadas para la separación de otros tipos celulares concretos: Nycoprep -1.077 para células mononucleares, Nycoprep- 1.068 para monocitos, Polymorphoprep -para células polimorfonucleares y Nycoprep- 1.063 para plaquetas.

Centrifugación zonal o de velocidad de sedimentación

Se utiliza para separar tipos celulares cuyo coeficiente de sedimentación difiere; es preciso acudir a medios que forman un gradiente de densidad, lo que favorece la concentración de cada tipo celular en una banda o zona estrecha. El gradiente de densidad es generado antes de añadir la muestra, mediante varias soluciones de distinta concentración de un compuesto adecuado (Ficoll, sacarosa, albúmina, suero fetal bovino).

Luego de la formación del gradiente, un pequeño volumen de muestra se deposita sobre ésta y se centrifuga por un corto tiempo. Habitualmente se emplea un gradiente cuya densidad máxima es inferior al de las células, por lo que no es posible alcanzar el equilibrio de sedimentación. Se emplean siempre tiempos menores; si se centrifugan lo suficiente todas las células terminarían en el fondo, es así como, el resultado es dependiente del tiempo de centrifugación. Con esta técnica se consigue separar todos los tipos celulares sanguíneos, purificar espermatozoides viables, separar células viables y no viables de tejidos disgregados, y muestras con células en suspensión (Figura 3).

Centrifugación isopícnica o de equilibrio de sedimentación

Es un método en el cual se separan células exclusivamente en función de su densidad empleando otra variante de centrifugación, llamada isopícnica (der. Griego. De igual densidad). Se realiza también sobre un gradiente de densidad, pero en este caso el tiempo de centrifugación es lo suficientemente largo como para que se alcance el equilibrio de sedimentación. Para conseguir el equilibrio de sedimentación se usan gradientes continuos que cubren todo el intervalo de densidades de las células: en el fondo del tubo la densidad ha de ser mayor que la de las células

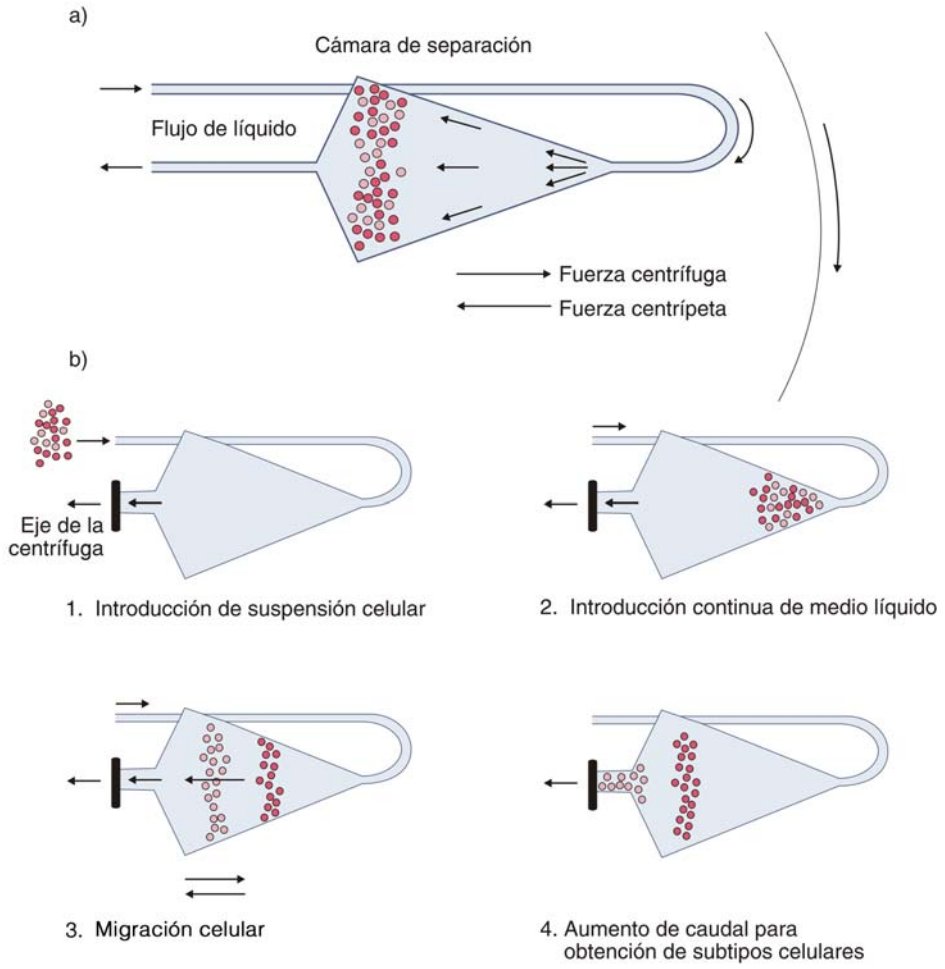


FIGURA 4.
Elutriación.
a. Cámara de separación por elutriación. b. Proceso de elutriación. 1. Introducción de la suspensión celular. 2. La fuerza centrífuga empuja las células al fondo de la cámara; introducción continua de medio líquido, el cual se opone a la fuerza centrífuga. 3. Migración celular en el caudal y obtención de un equilibrio dinámico. 4. Aumento del caudal para recuperación de las poblaciones celulares separadas.

más densas. De esta forma, independiente del tiempo de centrifugación, las células nunca sedimentarán en el fondo, sino que alcanzan una posición estable intermedia en el gradiente.

Elutración centrífuga

Consiste en la separación de células de acuerdo con su velocidad de sedimentación. El proceso original consistente en la realización de ciclos sucesivos de sedimentación y decantación, que fue facilitado por la incorporación al sistema de flujo del propio medio líquido de suspensión, en sentido contrario a la sedimentación (contra gravedad). Fue finalmente combinado con el efecto de la fuerza centrífuga, dando lugar a la elutración centrífuga. Aquí las células se ven expuestas a dos fuerzas opuestas, por una parte la fuerza centrífuga y por otra la fuerza de arrastre por el flujo continuo del medio en sentido contrario (Figura 4).

Con lo anterior se obtiene un método versátil, rápido y eficaz para la separación de subpoblaciones celulares según su tamaño a partir de una mezcla en suspensión. Admite altas concentraciones celulares e incluso permite obtener una mayor proporción de células viables respecto a la célula original.

Caracterización y separación de células por citometría de flujo

Hoy es un método importante en la investigación biomédica y en el laboratorio clínico, especialmente por su capacidad para el análisis automático de suspensiones celulares. El instrumento empleado se basa en el transporte de una suspensión celular (células sanguíneas, aspirado medular, tejidos asociados) impulsada por un flujo en solución isotónica, al punto de medición o cámara de flujo. En su aplicación habitual la citometría de flujo analiza y separa células previamente marcadas con un fluorocromo (Figura 5).

El procedimiento consta de dos etapas: caracterización y separación. Algunos citómetros sólo realizan la primera, mientras que otros llevan a cabo las dos etapas.

a. *Caracterización de una población celular:* El sistema consigue que la suspensión celular llegue en condiciones de flujo laminar, formando un hilo muy fino que contiene las células individuales en sucesión. Éstas pasan de una en una a través de un láser, cuya longitud de onda permite la excitación de los marcadores fluorescentes incorporados previamente. En la luz emergente de cada célula se analiza la dispersión y la intensidad de la fluorescencia.
b. *Separación de células:* clasificador de células activado por fluorescencia (FACS)

La corriente del líquido al pasar por el punto de detección, se transforma en una sucesión de gotas muy pequeñas (como consecuencia de una vibración aplicada por ultrasonidos de la cámara de flujo), las cuales contienen como máximo una sola célula. Al mismo tiempo, en función de los resultados del análisis anterior de la célula, el clasificador aplica automáticamente a cada gota un pulso de voltaje que le proporciona una carga eléctrica. El usuario define previamente el pulso que se ha de aplicar a cada gota, y por tanto, el signo y la cuantía de la carga que adquirirá, en función de los criterios sobre los parámetros del análisis en el citómetro. El sistema que controla el analizador y clasificador permite tal decisión en el breve intervalo transcurrido entre el paso de cada célula por el detector y la formación de la gota que contiene. A continuación, las gotas cargadas pasan por un campo eléctrico, donde son desviadas de acuerdo a su carga para caer en distintos tubos de recolección de muestra (Figura 5).

De las aplicaciones más funcionales de esta técnica podemos mencionar: el estudio de anticuerpos monoclonales para superficie y contenido celular, la valoración del contenido de DNA y RNA de la célula y la determinación de su forma y tamaño.

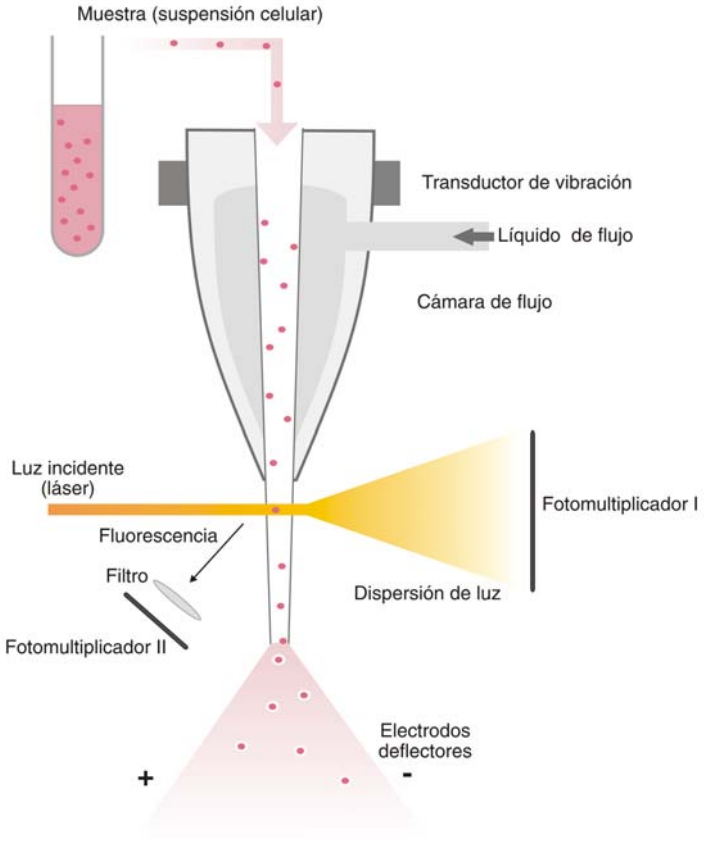


FIGURA 5.
Citometría de flujo.
Principios de operación del citómetro de flujo (ver texto). (Tomado de Freshney RI, 1994).

Separaciones por afinidad con partículas magnéticas

Este proceso es de gran aplicación. Actualmente, se hacen uso de microesferas disponibles comercialmente en varios tamaños (0,5 - 10 µm) con distintas probabilidades de aplicación; están formadas por un material superparamagnético (óxido de hierro) recubierto de una capa fina de polímero plástico que permite la absorción y/o la unión

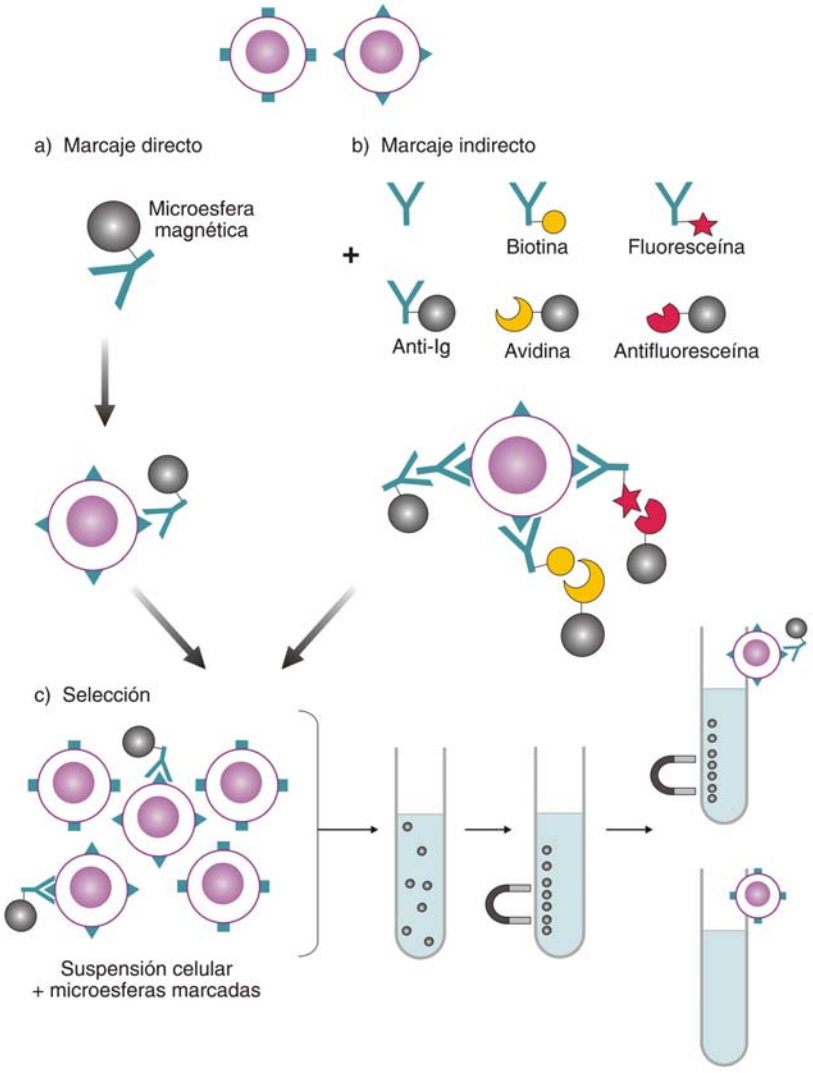


FIGURA 6.
Separación por afinidad con partículas magnéticas.
a. Marcaje directo: microesfera unida covalentemente al dominio Fc del anticuerpo específico para las células blanco, al reconocer el anticuerpo por el antígeno. b. Marcaje indirecto: se usan dos tipos de reactivos, un anticuerpo primario sin modificar unido covalentemente a un marcador (biotina, fluoresceína) y una microesfera magnética unida respectivamente con un anticuerpo secundario (Anti-Ig, avidina, anticuerpo antifluoresceína). En cualquiera de los casos las células blanco quedarán rodeadas por microesferas magnéticas. c. Selección: Suspensión marcada con partículas magnéticas. Retención en el tubo o placa de cultivo de los complejos magnético formados. Selección positiva: unión de las microesferas las cuales quieren ser separadas. Selección negativa: se marcan las microesferas con todos los tipos celulares excepto el de interés.

covalente de diferentes moléculas. Frecuentemente se les une un anticuerpo, para formar anticuerpos magnéticos o microesferas inmunomagnéticas (Figura 6).

Conteo y viabilidad celular

La determinación de la cantidad de células disponibles es importante para la estandarización de las condiciones para técnicas de cultivo celular y para el desarrollo de experimentos celulares precisos. El conteo se lleva a cabo con ayuda de un hematocitómetro diseñado como cámara de conteo. Éste consta de una cámara central (cámara de conteo doble) que se divide en dos partes por una hendidura transversal de 1mm. Cada cámara consiste en una película plateada en la que está grabada una rejilla de 3x3 mm. Cada rejilla se divide en nueve cuadros secundarios, cada uno de 1x1 mm. Los recuadros de las esquinas se dividen en 16 cuadros terciarios y el cuadro central en 25 terciarios. El hematocitómetro se acompaña de un cubreobjetos delgado de superficie lisa con un peso que determina la profundidad exacta al colocarse sobre la laminilla.

Es importante confirmar el estado vital de las muestras celulares durante el procesamiento en el laboratorio. El concepto de viabilidad alude a la capacidad de una célula para realizar sus procesos fisiológicos y bioquímicos, especialmente en lo que respecta a su metabolismo y su capacidad de división. Sin embargo, en la práctica el término es relativo, pues es utilizado con diversos criterios, es común que se hable de viabilidad al referirse a la integridad de la célula o bien su actividad metabólica, o su capacidad proliferativa.

Con el uso de un colorante vital de exclusión es posible determinar la viabilidad (Figura 7). Este principio se basa en el hecho de que las células vivas poseen una membrana intacta que excluye ciertos colorantes como el azul de tripano, eosina o yoduro de propidio, mientras que las células muertas permiten el paso al citoplasma. La suspensión celular se mezcla con un volumen conocido de colorante y se examinan visualmente para determinar las células muertas y vivas. En el caso de azul de tripano, el citoplasma se observa refringente en las vivas, mientras que el citoplasma de las células muertas se observa azul; con el yoduro de propidio las células muertas se tiñen de rojo y se observan en el microscopio de fluorescencia.

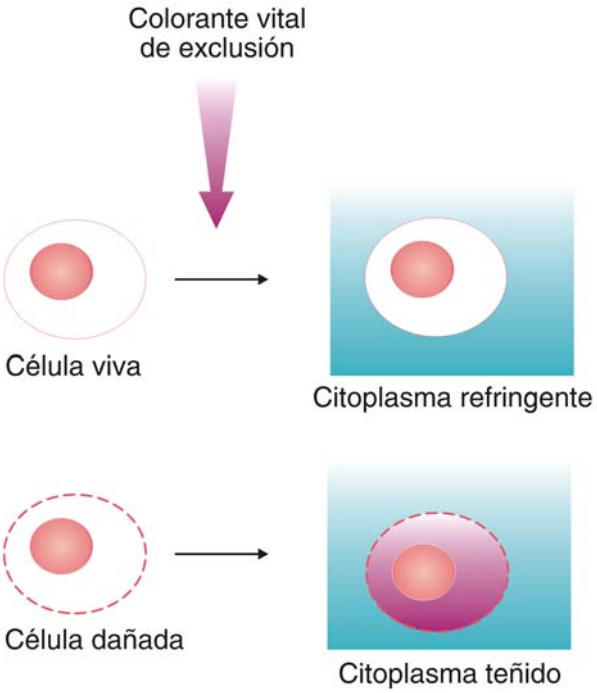


FIGURA 7.
Viabilidad celular.
Ensayos de exclusión.

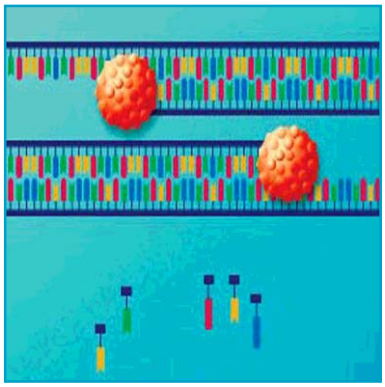
Lecturas recomendadas

1. Freshney Ri. Culture Of Animal Cells. A Manual Of Basic Technique. John Wiley & Sons. Edimburg Gate, Harlow. 1994
2. Reed R, Holmes D, Weyers J et al. Practical Skills in Biomolecular Sciences. Addison Wesley Longman Limited. New York, NY. 1998
3. Luque José, Herraéz A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ediciones Harcourt S.A. Madrid, España. 2001
4. Zachary AA, Teresi G (Editores). ASHI Laboratory Manual. Segunda Edición. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). Kansas. 1990
5. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory Manual. Tercera Edición
6. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 1982
7. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 2001
8. Cell Separation and Protein Purification. Technical Handbook. Dynal SA. 1996
9. Fundamental Techniques in Cell Culture. A laboratory Handbook. Sigma Aldrich. www.sigma-aldrich.com

41

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA - PCR

Paula A. Correa
John Castiblanco



Contenido

Historia
Principio del método
Condiciones y componentes de una reacción de PCR
Aspectos relevantes de la técnica de PCR
Control de calidad de la PCR
Problemas y soluciones en las reacciones de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación enzimática, de secuencias de DNA específicas. Este método fue desarrollado en los años 80 y desde entonces se han generado varias modificaciones a la técnica original, además de que han surgido muchas aplicaciones adicionales a las planteadas en principio, desde la identificación de las posiciones de un gen dentro de un cromosoma, hasta la secuencia específica de un gen. La amplificación de secuencias específicas de DNA está basada en las propiedades de las polimerasas de sintetizar nuevas cadenas de DNA a partir de secuencias moldes, utilizando iniciadores de secuencia específica que flanquean los extremos del fragmento de DNA de interés y pueden por medio de la enzima Taq DNA polimerasa, sintetizar nuevas cadenas de DNA. En este capítulo se describen los principios, aplicaciones, ventajas y desventajas de la técnica de PCR, así como las condiciones básicas a ser tenidas en cuenta para el diseño de una mezcla de PCR y de las variaciones de temperatura sugeridas para obtener un buen producto de amplificación. Adicionalmente, se contemplan algunos de los parámetros claves para un adecuado control de calidad en la reacción y por ende la obtención de resultados confiables, rápidos y específicos, bien sea para el campo del diagnóstico o para el de la investigación.

Historia

El principio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue reportado por primera vez en 1983 por Kary Mullis, pero sólo hasta el año 1989, con el descubrimiento de la enzima polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermophylus aquaticus*, *Taq* DNA polimerasa, la implementación de esta tecnología se hizo posible. La técnica fue usada inicialmente en el diagnóstico de enfermedades, cuando un grupo de investigadores identificaron el gen involucrado en la anemia falciforme. Casi al mismo tiempo la metodología comenzó a implementarse en la medicina forense y que así como la PCR rápidamente recibió los más grandes honores científicos, al igual que para su inventor, otorgándosele el premio Nobel de Química en el año 1993, gracias a que la técnica proporcionó una solución a muchos de los problemas más fascinantes de la biología moderna, entre ellos, la replicación del DNA.

Inicialmente el procedimiento se realizó manualmente con incubadoras a temperaturas variables, a través de las cuales se cambiaba cada tubo de reacción y se adicionaba enzima en cada nuevo ciclo. Treinta años después comenzaron a aparecer los termocicladores, los cuales de forma automatizada permiten realizar los diferentes ciclos de temperatura, sin necesidad de adicionar enzima nuevamente. Este paso de automatización ha permitido generar un sin número de aplicaciones para esta técnica (Caja 1). El propósito de este capítulo es ayudar a implementar la metodología de la forma más apropiada, optimizar los recursos y corregir los posibles problemas que pueden surgir durante su desarrollo.

Caja 1. Aplicaciones de la PCR

- Diagnóstico y seguimiento de enfermedades genéticas y cáncer
- Detección rápida de bajas cantidades de microorganismos y virus
- Tipificación de HLA en transplantes
- Análisis de DNA en laboratorios forenses por huellas genómicas
- Análisis de material genético antiguo o archivado
- Generación de sondas de ácidos nucleicos
- Clonación de genes
- Mapeo de genes
- Secuenciación

Principio del método

La PCR es un método rápido, económico y simple para generar múltiples copias de un fragmento de DNA a partir de una molécula molde conocida como templado. La PCR se desarrolla por medio de un método enzimático, *in vitro*, el cual genera millones de copias idénticas de un fragmento de DNA, basado en el conocimiento de la secuencia de las regiones adyacentes al fragmento de DNA de interés. Partiendo de este conocimiento es posible sintetizar dos oligonucleotidos o iniciadores (primers), complementarios a cada una de las cadenas del templado de DNA que se ubicaran en las regiones flanqueantes. La PCR se inicia una vez el DNA de doble cadena se ha desnaturalizado, para permitir a los iniciadores hibridarse (annealing) con cada una de las cadenas del DNA molde. Este paso es seguido por una reacción enzimática de extensión, en la cual la enzima *Taq* DNA polimerasa permite adicionar nucleótidos complementarios a la cadena molde a partir del extremo 3' de cada uno de los iniciadores, generando dos nuevas moléculas de DNA de doble cadena. De tal manera, cada ciclo de PCR está compuesto por tres diferentes pasos, desarrollados de igual forma a diferentes temperaturas (Figura 1).

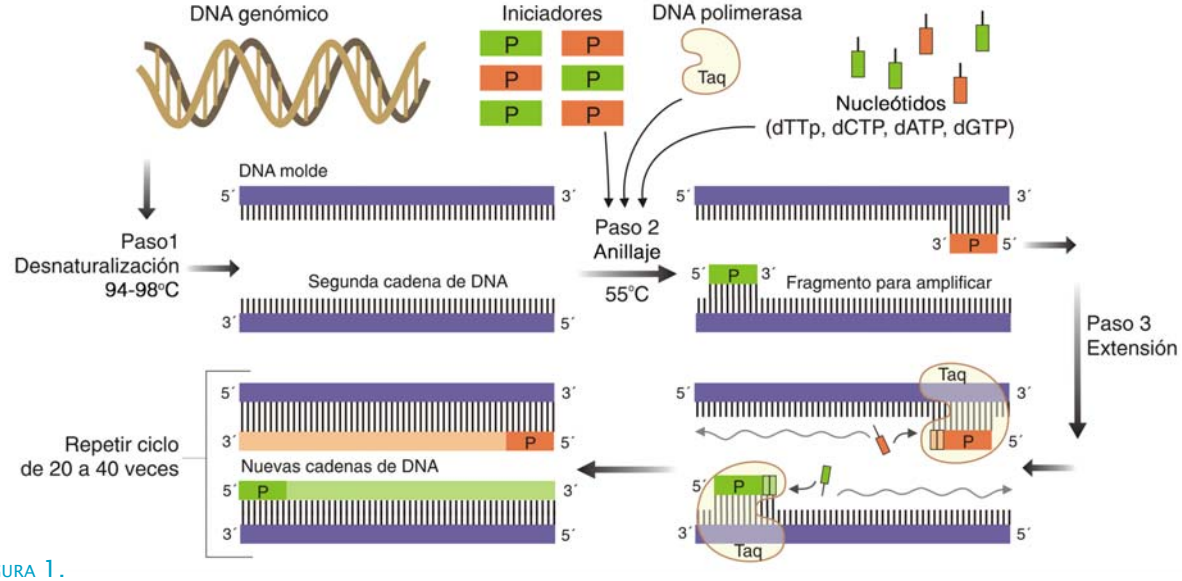


FIGURA 1.
Pasos para cada uno de los ciclos de PCR.
1. Desnaturalización de la doble cadena de DNA. 2. Anidaje de los iniciadores con su secuencia blanco. 3. Extensión de las nuevas cadenas de DNA, por medio de la enzima *Taq* DNA polimerasa.

1. Desnaturalización del DNA de doble cadena por calentamiento a una temperatura entre 94 -98 °C, la cual crea dos cadenas individuales del DNA blanco.
2. Anillaje (annealing) de los iniciadores específicos a la secuencia flanqueante del templado de DNA, el cual puede ocurrir entre 37 -72 °C.
3. Extensión de los iniciadores por medio de la enzima *Taq* DNA polimerasa utilizando deoxinucleótidos complementarios al templado de DNA a 72 °C, este paso debe desarrollarse durante un tiempo suficiente para generar un producto de DNA que puede exceder incluso los 1.000 pb y teniendo en cuenta la velocidad de acción de la enzima.

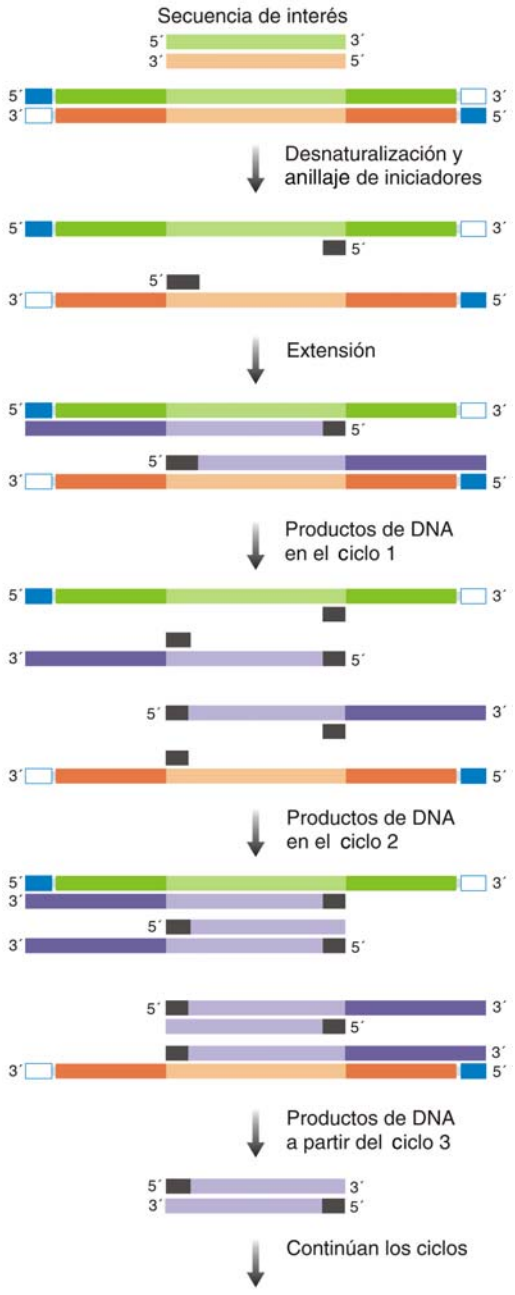

Secuencia de interés
Desnaturalización y anillaje de iniciadores
Extensión
Productos de DNA en el ciclo 1
Productos de DNA en el ciclo 2
Productos de DNA a partir del ciclo 3
Continúan los ciclos

FIGURA 2.
Conformación de las cadenas del nuevo DNA sintetizado, luego de cada ciclo.

Durante el primer ciclo de una PCR, el producto que se da por la extensión del par de iniciadores, se convertirá en la nueva secuencia molde para el siguiente ciclo (Figura 2). Los ciclos sucesivos generarán un crecimiento exponencial del número de fragmentos de DNA de interés, que encontrará su señal de finalización al toparse con el extremo 5' de cada uno de los iniciadores. Teóricamente, cada ciclo deberá generar el doble de moléculas de DNA que se encontraban en el ciclo inmediatamente anterior, por tanto la cantidad final de DNA será = 2^n, donde *n* corresponde al número de ciclos. Se calcula que 1 µg de DNA puede ser producido durante 25-30 ciclos de una reacción de PCR, partiendo de 50 ng de DNA genómico, asumiendo una eficiencia del 100% durante el proceso. Luego de terminados los ciclos, el producto de PCR será suficiente para ser visualizado en un gel, marcado con bromuro de etidio, utilizando la técnica de electroforesis.

Los cambios de temperatura durante la PCR son generalmente controlados utilizando un equipo conocido con el nombre de termociclador, el cual consiste de un bloque incubador que permite programar y regular variadas temperaturas y tiempos para cada uno de los ciclos de la PCR y durante todo el proceso (Figura 3).

FIGURA 3.
Equipo termociclador para la elaboración automática de los diferentes pasos de la PCR.
El termociclador cuenta con una plataforma de calentamiento, una pantalla y teclado para el ajuste y observación de los parámetros de la PCR y una tapa con la capacidad de calentarse para evitar la evaporación de la mezcla de cada reacción.

Condiciones y componentes de una reacción de PCR

Toda reacción de PCR, bien sea de estuche comercial o de elaboración "casera", incluye la enzima *Taq* DNA polimerasa, deoxinucleótidos (dNTPs), tampón de reacción, el cual generalmente está conformado por un detergente no iónico, KCl y albúmina sérica bovina. Adicionalmente, la mezcla debe contener cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cofactor para la correcta activación y polimerización de la enzima, los oligonucleótidos específicos que se mencionaron en párrafos anteriores y la concentración adecuada de DNA molde. Los protocolos de PCR varían considerablemente de acuerdo con las aplicaciones que se les desee dar; sin embargo, se describirán las consideraciones básicas y el procedimiento típico para llevar a cabo una reacción de PCR (Caja 2), a partir del cual se pueda adaptar

una metodología guía para cada una de las necesidades que puedan surgir en el laboratorio.

Caja 2. Proporciones y componentes de una mezcla de PCR básica con un producto de 1 Kb

Componente	Concentración	Volumen
Agua destilada estéril	Ajustar el volumen	Ajustar a 50 µl
Tampón de reacción	Diluir a 1X	5 µl
Cloruro de Magnesio	1.5-2.5 mM	3-5 µl
dNTPs	200 µM	1 µl
Iniciador 5'	10 pmoles	1 µl
Iniciador 3'	10 pmoles	1 µl
Enzima *Taq* DNA polimerasa	1 Unidad	0.1 µl
DNA molde	50-200 ng	—
Volumen final	50 µl	

Condiciones generales

- Los oligonucleótidos deben tener un tamaño entre 18-30 bases. Oligonucleótidos de secuencias menores de 18 bases pueden repetirse varias veces en un genoma eucariota y generar productos de PCR inespecíficos. Por otra parte, oligonucleótidos mayores de 30 bases ofrecen mayor dificultad de anillaje (annealing) durante la reacción y, por lo tanto, puede ser difícil obtener un producto de amplificación. Ambos oligonucleótidos (sentido 5' y antisentido 3') deberán tener la misma proporción de G+C en su conformación, para asegurar que la temperatura de anillaje, la cual está determinada por el contenido de estas dos bases, sea similar para ambos iniciadores y así se facilite la amplificación del DNA. Además, estos iniciadores deben tener la mínima capacidad de complementariedad para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos "primer dimer", lo cual genera la aparición de estructuras secundarias en el producto de la PCR.
  Para la mayoría de las aplicaciones se requiere una concentración final de 0.1 μM o 10 pMoles, lo cual genera un exceso de oligonucleótidos en la reacción de 10^7 moléculas, con respecto al templado de DNA, considerando que esté fuera de 50 ng para 10 μl finales de reacción de PCR.
- La temperatura de anillaje está basada en la temperatura media de hibridación (Tm) del oligonucleótido. Ésta equivaldrá a la temperatura en la cual el 50% de los iniciadores están anillados en su secuencia blanco. Para oligonucleótidos < 20 bases, la *Tm* puede ser calculada en grados centígrados, basados en la ecuación:
  $Tm = 4\ (G+C) + 2\ (A+T)$
  Donde G, C, A y T son el número de bases presentes en cada iniciador. La *Tm* será utilizada como el punto de inicio (teórico) de la temperatura de anillaje, sin embargo el punto óptimo de temperatura, generalmente es determinado por ensayo-error, usando el termociclador para tal fin.
- Los dNTPs pueden ser usados en una concentración de 200 µM, la cual puede contener el exceso inicial necesario para la incorporación en una cadena de DNA hasta de 1 Kb.
- Otra de las variables claves en la reacción de PCR es la concentración de $MgCl_2$, requerido como cofactor para la *Taq* DNA polimerasa. Excesos en la concentración de $MgCl_2$ pueden impedir la desnaturalización completa de las moléculas de DNA durante cada ciclo de PCR, ya que es un estabilizador del DNA de doble cadena. Estos excesos también promueven el anillaje inespecífico de los iniciadores; sin embargo, bajas concentraciones de $MgCl_2$ pueden generar alteraciones en el paso de extensión durante la PCR por mal funcionamiento de la enzima y, por consiguiente, puede no generarse un producto de amplificación. Las concentraciones adecuadas de $MgCl_2$ se manejan por lo general en un rango entre 1 -2.5 µM en el volumen final de la reacción. No obstante, el punto óptimo de este cofactor, sólo logra establecerse a través de pruebas con ensayo-error.
- La enzima termoestable más frecuentemente utilizada es la *Taq* polimerasa, la cual extiende, a partir de los iniciadores, el DNA a una relación de 2-4 kb por minuto y a una temperatura óptima de 72°C. Generalmente, esta enzima es utilizada a una concentración > 1 nM o su equivalente, que sería > 0.1 U por cada 5 ul de reacción de PCR. Una de las desventajas de la enzima *Taq* DNA polimerasa es la alta tasa de error en la incorporación de bases (un nucleótido aberrado por cada 100.000 nucleótidos extendidos, por ciclo de reacción). Otras polimerasas están disponibles en el mercado como es el caso de la enzima VENT, extraída de la bacteria *T. litoralis* o formas genéticamente modificadas de la enzima *Taq* polimerasa del *T. acuaticus*, como es el caso de la *Taq* Gold, las cuales tienen una tasa mucho menor de error en la incorporación de nucleótidos durante el paso de extensión.
- A pesar de que tanto las temperaturas de incubación, como el tiempo y el número de ciclos pueden variar de un protocolo a otro y de las aplicaciones que se le va-

Caja 3. Perfil de temperatura para una PCR básica con un producto de 1 Kb

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de veces
Desnaturalización inicial	94-98 °C	2-5 minutos	1
Desnaturalización	94-98 °C	1 minuto	30-45
Anidaje	35-70 °C (Según Tm)	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión Final	72°C	3-5 minutos	1
Refrigeración	4-8 °C	opcional	

yan a dar a la reacción de PCR, se considera que para una fragmento de DNA molde de unas 1000 b un perfil de temperatura básico y adecuado, deberá estar diseñado de la siguiente manera (Caja 3):
Un periodo de desnaturalización inicial de 5 minutos a una temperatura entre 94- 98 °C, teniendo en cuenta que a mayor temperatura menor tiempo, y así evitar la pérdida de fracciones de moléculas de enzima activas. Las condiciones siguientes componen cada uno de los ciclos de amplificación, con cada uno de sus respectivos pasos. Una desnaturalización entre 94-98°C, con una duración no mayor a 1 minuto, seguido de una temperatura de anidaje entre 35 y 72 °C, dependiendo de la composición de bases del iniciador y la especificidad que se desea lograr en la reacción, (teniendo en cuenta que a mayor temperatura mayor especificidad). La temperatura de anillaje de los iniciadores dependerá de la *Tm* como se mencionó anteriormente y el tiempo varía entre 30 segundos y un minuto. La temperatura final para cada ciclo corresponde a la extensión, la cual debe estar entre 65° y 72 °C, las cuales se consideradas óptimas para el funcionamiento de la enzima. El tiempo para este último paso dependerá del tamaño del DNA que se desea amplificar, considerando que la *Taq* DNA polimerasa tiene la capacidad de extender hasta 4.000 b por minuto.

Aspectos relevantes de la técnica de PCR

A pesar de las múltiples aplicaciones de esta técnica, su utilidad real radica en el control de calidad que se realice, en el conocimiento del principio metodológico y en el control de los parámetros propios de la técnica, tal como son: la fidelidad, especificidad, sensibilidad y eficiencia.

La *fidelidad* se define como la capacidad de la enzima para insertar el nucleótido apropiado, según la secuencia del DNA molde, y en la capacidad de eliminar aquellos que entran por error en la nueva cadena sintetizada. La *fidelidad* de la reacción no sólo depende de la función de la enzima sino también de la optimización de las condiciones de la misma. La *especificidad* de la reacción, se refiere a que el producto amplificado por PCR corresponda específicamente a la secuencia blanco que se pretende analizar. Esta característica depende, principalmente del adecuado diseño de los iniciadores, de la temperatura de anillaje, la concentración del DNA y de $MgCl_2$ y del número de ciclos en los que se lleve a cabo la reacción. La *sensibilidad* y *eficiencia* por su parte, se refieren a la posibilidad de obtener un mejor producto de amplificación, aunque el numero de moléculas de DNA molde sea muy bajo y se encuentre mezclado con otros materiales genéticos de diferentes orígenes. En algunos casos se observa que a mayor eficiencia menor especificidad, lo cual puede ser contraproducente para el resultado final. La reacción ideal buscará siempre el equilibrio entre la *especificidad* y la *sensibilidad.*

Control de calidad de la PCR

Dada la capacidad de amplificación de la PCR, es necesario mantener un estricto control de calidad en cada una de las pruebas que se llevan a cabo en el laboratorio, para evitar la contaminación de las muestras, los reactivos y el área de trabajo, lo cual originaría, falsos positivos. El control de calidad busca minimizar las fuentes de contaminación cruzada y definir estrategias que ayuden a identificarlas. Este control se obtiene aplicando buenos controles positivos y negativos a cada experimento.

Los controles positivos generalmente corresponden a muestras de DNA que contienen un alto número de copias, de concentración conocida y preferiblemente con resultados previamente confirmados del fragmento de DNA que se está amplificando. Este DNA debe tener una excelente calidad, debe almacenarse adecuadamente con soluciones tampón que eviten su degradación, tales como el tampón TE (Tris-EDTA). Dicho control permitirá establecer el correcto funcionamiento de los reactivos y el protocolo de amplificación, descartando algún problema de amplificación generado por la calidad del DNA.

El control negativo corresponde a una reacción en la cual se encuentran todos los componentes de la mezcla, excepto el DNA. Este control permitirá evaluar las amplificaciones inespecíficas, y dará cuenta de la existencia o no de contaminantes en la reacción. Para un control de calidad estricto se recomienda incluir dos controles negativos, uno al comienzo de la servida de las muestras de PCR, que indicará si no hay contaminación en los reactivos, y uno al final de la servida que dará cuenta de que no se produjo un problema de arrastre de material genómico durante el proceso.

Algunos tipos de PCR, deben contener además, un control interno de reacción. Éste generalmente corresponde a la inclusión de un par de iniciadores que amplifiquen genes constitutivos, a unas condiciones similares a las del producto de interés, para asegurarse que tanto la mezcla como el perfil de temperatura de la PCR están funcionando correctamente y, además, ayuda a descartar falsos negativos durante el análisis de los resultados.

¿Cómo evitar la contaminación?

El laboratorio de PCR, al igual que el operario, deben contar con una serie de condiciones especiales, que aseguren la confiabilidad de los resultados del DNA amplificado. Uno de los puntos claves para evitar la contaminación es la existencia de zonas de trabajo separadas así:

- *Zona de Pre-PCR:* En la cual se debe hacer la manipulación de las muestras de DNA genómico y extracción.
- *Zona de PCR:* En la que es posible la manipulación de los reactivos y materiales necesarios para la preparación de la reacción y donde se asegure que éstos no entrarán en contacto con ningún DNA o producto de amplificación que no sea el deseado. En este lugar deben existir materiales separados de la zona de pre-PCR.

- *Zona de post-PCR:* A esta zona corresponde las reacciones de manipulación, almacenamiento, análisis y verificación de los productos amplificados de PCR. Esta zona puede ser la de mayor contaminación con DNA, por lo que es necesario tener un estricto control de la entrada y salida de materiales de ésta, hacia las demás. Es importante manipular cuidadosamente los tubos de PCR para evitar salpicaduras y derrames que afecten los resultados.

Adicional a la separación del laboratorio, son necesarias otras precauciones:

- Uso de indumentaria apropiada para el laboratorio de biología molecular.
- Limpieza cuidadosa del sitio de trabajo, preferiblemente con soluciones descontaminantes de DNA (NaOH al 0,1 N-SDS al 2%).
- Diluir y repartir los reactivos en pequeñas cantidades de trabajo, con agua estéril, grado laboratorio, en tubos estériles y libres de DNAsas y RNAsas.

Problemas y soluciones en las reacciones de PCR

La PCR, a pesar de su eficiencia y sensibilidad, puede algunas veces ocasionar problemas, tales como resultados falsos negativos, falsos positivos o ausencia de amplificación en el peor de los casos. No obstante, si se siguen las recomendaciones discutidas a lo largo de este capítulo y se hace un correcto proceso de estandarización de las condiciones, será más fácil dar solución a los problemas que puedan surgir.

En la Tabla 1 se resumen algunos problemas, sus posibles causas, y las soluciones propuestas.

Lecturas recomendadas

1. Bartlett LM, Stirling D. PCR Protocols. Editorial Humana Press. Totowa NJ Segunda edición. 2003, 545
2. Reed R, Homes D, Weyers J, et al. Practical Skills in Biomolecular Science. Editorial LONGMAN, Hong Kong. 1998. 338
3. Day IN. Polymerase chain reaction. Br J Hosp Med. 1997,4:170-172
4. Grubb G. Techniques in Molecular Biology. Acta Orthop Scand Suppl. 1997;273:74-80

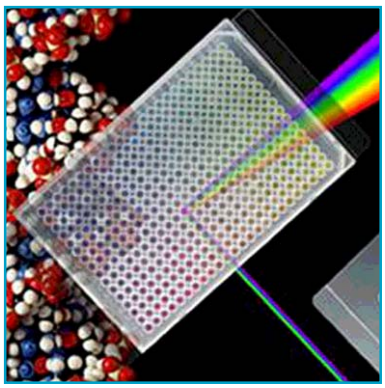
Tabla 1. Problemas y soluciones en la reacción de PCR.

Problema	Posibles causas	Posibles soluciones
Ausencia de amplificación	Calidad del DNA	Repurificación de la muestra, para eliminar inhibidores de la PCR. Reextracción de la muestra cuando hay problemas de degradación.
	Concentración del DNA	Concentraciones altas de DNA inhiben la PCR. Concentraciones bajas de DNA disminuyen la posibilidad de los iniciadores de encontrar la secuencia blanco.
	Enzima	Medir la actividad de la enzima, para descartar que esté inactiva o degradada.
	Iniciadores mal diseñados	Si la secuencia de los iniciadores no es la adecuada, difícilmente podrán encontrar la secuencia blanco y generar la amplificación.
	Baja concentración de iniciadores	Asegurar que la concentración del iniciador sea suficiente para encontrar la secuencia blanca e iniciar la amplificación en cada nuevo ciclo.
	Baja concentración de $MgCl_2$	Ajustar la concentración del Magnesio, de forma tal que sea suficiente para funcionar como cofactor de la enzima.
	Condiciones de los ciclos de temperatura	Verificar la *Tm* de los iniciadores, ajustar la temperatura de anillaje y extensión, disminuir el tiempo de desnaturalización.
Amplificación de productos inespecíficos	Diseño y concentración de los iniciadores	Verifique el tamaño de los iniciadores. A mayor tamaño mayor especificidad.
	Concentración de magnesio	Disminuya la concentración del magnesio para que aumente la astringencia.
	Concentración de DNA	Disminuya la concentración de DNA
	Condiciones de los ciclos de temperatura	Aumente la temperatura de anillaje y disminuya la de extensión.
	Cantidad de enzima	Disminuya el número de unidades de enzima por reacción.
Obtención de un producto no deseado	Secuencia de los iniciadores	Verifique la posición y la complementariedad de los iniciadores con el locus de interés.
	Contaminación de los reactivos	Verifique los controles negativos.
Formación de dímeros iniciadores	Secuencia de los iniciadores	Verifique que no haya complementariedad de bases entre los dos iniciadores.
	Concentración de los iniciadores	Disminuya la concentración de los iniciadores.
	Concentración de DNA	Aumente la concentración de DNA, para reducir el número de moléculas libres de los iniciadores.
	Condiciones de los ciclos de temperatura	Aumente la temperatura de desnaturalización y ajuste la temperatura de anillaje.

42

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR) Y DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

John Castiblanco
Paula A. Correa



La PCR genera copias a partir de un templado de DNA en forma exponencial; no obstante, debido a inhibidores en la reacción, a la limitación de reactivos y la acumulación de moléculas de pirofosfato, durante la amplificación, esta característica no siempre se observa en la práctica. La PCR en tiempo real brinda la posibilidad de medir los productos de PCR a medida que éstos se vayan dando (en «tiempo real») para luego extrapolarlos, a partir de la cantidad de templado inicial, al número de moléculas nuevas que se han sintetizado.

La técnica se basa en la detección y medición de productos generados durante la PCR; de esta forma, es necesario disponer de un método que exprese la acumulación del producto de PCR y un aparato que documente los resultados durante cada ciclo de la reacción, para lo cual se utilizan sondas doblemente marcadas con un reportero y un extinguidor, además de un equipo de PCR en tiempo real. Gran variedad de sistemas de sondas están disponibles para la PCR en tiempo real. Muchas de ellas útiles en los equipos generales, definidos para realizar la técnica.

A continuación se describen los principios básicos de realización, obtención de datos y análisis de la PCR en tiempo real. Además, como enfoque y aplicación específica, se describen los conceptos básicos de la discriminación alélica.

Contenido

PCR en tiempo real
Discriminación alélica
Principio del método
Detección de alelos
Aspectos críticos de la discriminación alélica

Introducción

El primer reporte de PCR en tiempo real fue documentado por Higuchi y colaboradores en 1993. Este procedimiento fue realizado utilizando bromuro de etidio durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un termociclador modificado para irradiar rayos UV y una cámara de detección. La señal recogida fue graficada en función de cada ciclo. Los datos finales daban cuenta de la cantidad de producto de PCR que era generado durante cada uno de los ciclos.

Teóricamente, la PCR genera copias a partir de un templado de DNA en forma exponencial; no obstante, debido a inhibidores en la reacción, a la limitación de reactivos y la acumulación de moléculas de pirofosfato, el crecimiento exponencial de las moléculas no siempre se observa en la práctica. Algunas reacciones generan más productos que otras; por tanto, la cuantificación se hace necesaria. La PCR en tiempo real brinda la posibilidad de medir los productos de PCR a medida que éstos se vayan acumulando (en "tiempo real"), facilitando la determinación de la cantidad de producto de PCR durante la fase exponencial, para poder extrapolar a partir de la cantidad inicial de templado inical el número de moléculas nuevas que se han sintetizado.

Durante la fase exponencial de la PCR en tiempo real, se realiza una medición inicial a partir de la emisión de fluorescencia basal con el objetivo de que todas las muestras utilizadas sean comparables y normalizadas. Esta señal es calculada en función de la cantidad de fluorescencia emitida por la reacción, previo a su duplicación exponencial y es graficada en un punto en donde la señal originada de una muestra es significativamente mayor que la señal fluorescente de fondo. De esta forma, el número de ciclos de PCR requeridos para generar suficiente señal de fluorescencia que sobrepase la señal basal, se le conoce como punto de corte (Cp, crosspoint) o ciclo umbral (Ct, threshold cycle). Los valores Cp son directamente proporcionales a la cantidad de templado inicial y son la base para calcular los niveles de expresión de mRNA o la cantidad de copias de DNA iniciales.

En la actualidad la tecnología se está en auge, ha mejorado su accesibilidad, validación y aceptación y se han ampliado sus aplicaciones. El incremento en la oferta de nuevos equipos y reactivos capaces de llevar a cabo la cuantificación y detección en tiempo real junto con la disminución en sus costos ha dado como resultado el acceso de muchos grupos de investigación y diagnóstico a esta tecnología.

Principios de la PCR en tiempo real

La técnica se basa en la detección y medición de productos generados durante la PCR; de esta forma, es necesario disponer de un método que exprese la acumulación del producto de PCR y un aparato que documente los resultados durante cada ciclo de la reacción. Dos importantes hallazgos llevaron al descubrimiento de la PCR en tiempo real: el primero encontrar que la *Taq* polimerasa posee actividad de exonucleasa en dirección 5' – 3'; y el segundo, la construcción de sondas de oligonucleótidos con doble marcaje basadas en el principio de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET).

Tomando en cuenta las características anteriores, Heid y colaboradores reportararon por primera vez los ensayos TaqMan. En este método la *Taq* polimerasa corta el extremo 5' de la sonda marcada e hibridada al DNA molde durante la fase de extensión de la PCR. Esta sonda es denominada sonda de hidrólisis o Taqman. La sonda se encuentra doblemente marcada, por el extremo 5', con un marcador reportero (Ej. FAM [6-carboxifluoresceina]), y por el 3' con un marcado extinguidor (quencher) (Ej. TAMRA [6-carboxitetrametilrodamina]). Mientras que la sonda esté intacta, la emisión de fluorescencia es absorbida por el extinguidor. En el momento en que la enzima fragmenta la sonda, los dos marcadores son separados y la absorción de la emisión cesa por parte del extinguidor (no más FRET), liberando la fluorescencia emitida por el reportero. Este proceso ocurre durante cada ciclo y no interviene en la generación del producto de PCR.

Hace poco, otros sistemas han sido desarrollados, entre ellos los faros moleculares ("molecular beacons"), las sondas escorpión y las sondas de hibridización. Todos estos sistemas dependen del principio FRET, aunque no siempre de la actividad nucleasa de la *Taq* polimerasa. De manera similar, se han utilizado otros cromógenos para DNA de doble cadena, tal como el SYBR Green I y el bromuro de etidio, para la cuantificación de productos de PCR, pero éstos no aplican el mismo principio de la tecnología TaqMan, ni utilizan la actividad de exonucleasa de la enzima.

Instrumentación requerida

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir en cada ciclo la fluorescencia emitida en cada una de las muestras. En general, todos los equipos conservan la ventaja de llevar a cabo la reacción en un sistema de tubo cerrado, disminuyendo así las posibilidades de contaminación de los productos de PCR y aumentando la especificidad y confiabilidad del resultado.

Sistemas de sondas

Gran variedad de sistemas de sondas están disponibles para la PCR en tiempo real. Muchas de ellas útiles en los equipos generales, definidos para realizar la técnica. A continuación se describen los diferentes sistemas de sondas utilizados para esta metodología.

Sondas de hidrólisis o Taqman

Para este sistema son usados tres oligonucleótidos: un iniciador sentido ("forward primer"), un antisentido ("reverse primer") y una sonda (Figura 1). Todos ellos son específicos para la secuencia de DNA que se desea analizar. El método es dependiente de la actividad de nucleasa 5' - 3' de la *Taq* polimerasa, por tal motivo es recomenda-

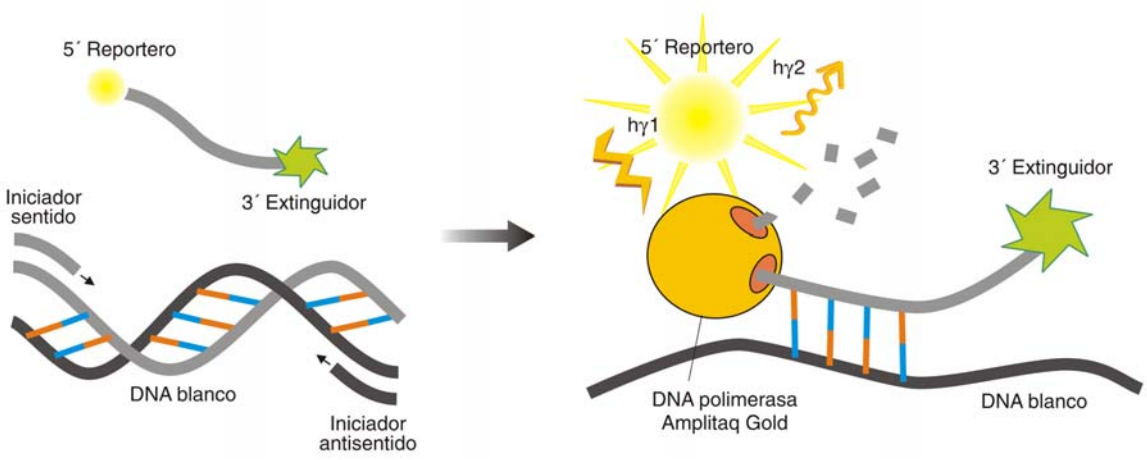


FIGURA 1.
Elementos que componen el sistema de sondas de hidrólisis o TaqMan.

ble escoger una enzima apropiada con la suficiente actividad y fidelidad que necesita la técnica.

Como se mencionó antes, la sonda se encuentra doblemente marcada, por un extremo con un fluorocromo reportero y por otro un marcado extinguidor (quencher). Mientras que la sonda esté intacta, la emisión de fluorescencia es absorbida por el extinguidor. El marcador fluorescente se encuentra unido covalentemente al extremo 5' y puede ser FAM (6 -carboxiflouresceina), TET (tetracloro -6- carxifluoresceina), JOE (2, 7 -dimetoxi- 4, 5 -dicloro -6- carboxifluoresceina), HEX (hexacloro -6- carboxifluoresceina) o VIC. El extinguidor unido al extremo 3', puede ser TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) o DABCYL [4 -(4' -dimetilaminofenilazo) ácido benzoico] (Figura 2). Una ventaja para este extinguidor en este tipo de sondas es la reducción de la auto-fluorescencia.

La proximidad del extinguidor y el fluorocromo permiten que haya FRET, de esta forma no se origina señal de fluorescencia. Durante la reacción de PCR, si la secuencia blanco está presente, la sonda anilla específicamente, y por medio de la actividad nucleasa se libera el fluorocromo y se inicia la emisión de fluorescencia. El aumento en la intensidad de fluorescencia es medido durante cada ciclo de la reacción y como consecuencia directa del proceso de amplificación.

Sondas en faro (Molecular beacons)

Las sondas de este sistema presentan una estructura secundaria en forma de asa, establecida a partir de una molécula de cadena sencilla de DNA, que posee secuencias complementarias de 4 a 6 nucleótidos que conforman la estructura (Figura 3). Un fluorocromo está unido a un extremo de la sonda y un extinguidor al extremo opuesto. La fluorescencia es absorbida mientras mantenga su estructura secundaria, gracias a la proximidad del extinguidor y el fluorocromo permitiendo la FRET. En el momento que la secuencia de la parte central de la sonda hibrida con el DNA blanco, un cambio conformacional es producido, eliminando el efecto FRET e iniciando la señal de fluorescencia, la cual es directamente proporcional a la cantidad de templado en la muestra. El sistema de sondas faros es adecuado para la identificación de mutaciones puntuales, debido a que pueden distinguir secuencias que difieren hasta de un solo nucleótido y son mucho más específicas que otras sondas de la misma longitud.

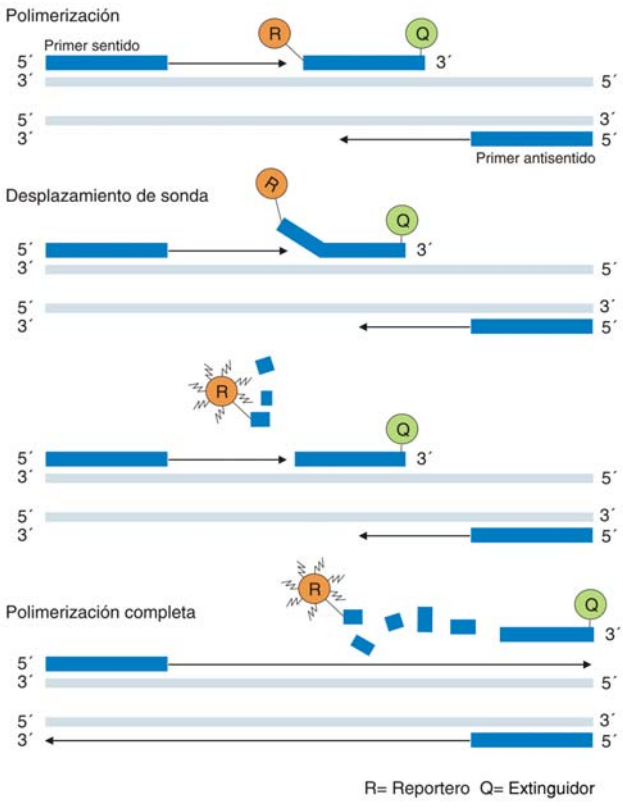


FIGURA 2.
Forma de emisión de fluorescencia en el sistema de las sondas TaqMan.
Durante la fase de extensión, la sonda es cortada en dirección 5´-3´ por la actividad de exonucleasa de la *Taq* polimerasa. De esta manera el extinguidor y el fluorocromo son separados permitien-do la emisión de la señal fluorescente.

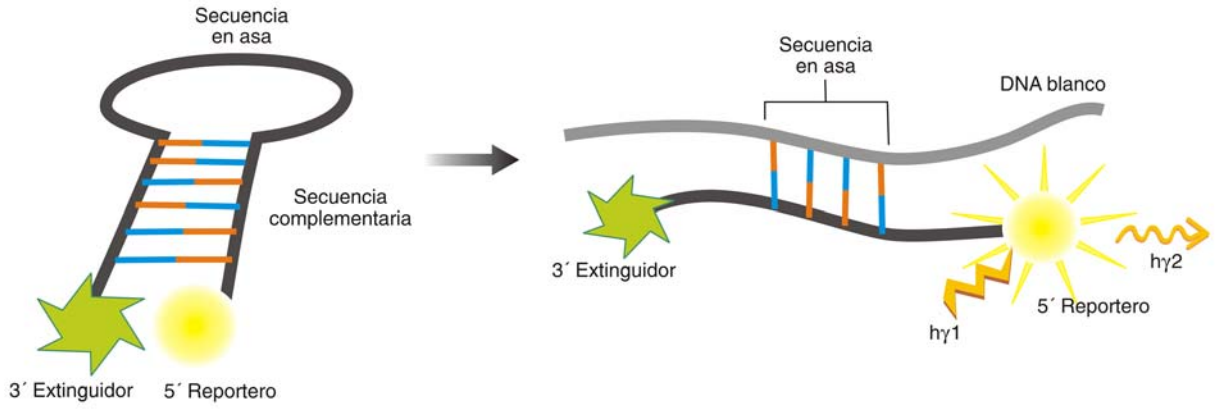


FIGURA 3.
Sondas faro.
La sonda posee una estructura secundaria; de esta forma, el extinguidor y el fluorocromo están muy cercanos, evitando la emisión de fluorescencia. En el momento en el cual la sonda hibridiza con la secuencia blanco su estructura cambia provocando la separación del extinguidor del fluorocromo, permitiendo la emisión de fluorescencia.

Sondas escorpión

Los elementos básicos de este sistema son un iniciador de PCR, una secuencia bloqueadora de la actividad 5' nucleasa de la enzima, la sonda específica y el sistema de detección, compuesto por el fluorocromo reportero y el extinguidor (Figura 4). El iniciador forma parte de la sonda, en su extremo 3'; la sonda consiste de una estructura secundaria, formada a partir de secuencias complementarias (de 4 a 6 nucleótidos) que forman una horquilla de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos. En el extremo 5' de la horquilla se encuentra el reportero fluorescente, mientras que el extinguidor está ubicado al interior del sistema, entre la sonda y el bloqueador. La secuencia bloquedora previene la actividad nucleasa de la enzima *Taq* polimerasa. Las sondas cumplen su función después de la extensión del iniciador en la PCR, ya que el amplificado resultante contiene una secuencia complementaria a la sonda que genera la apertura de la horquilla, iniciando la emisión de fluorescencia, luego de disolver la estructura secundaria y de detener la FRET. Las sondas escorpión generan alta especificidad, debido a que la emisión de fluorescencia sólo ocurre cuando el blanco específico se encuentra presente en la reacción.

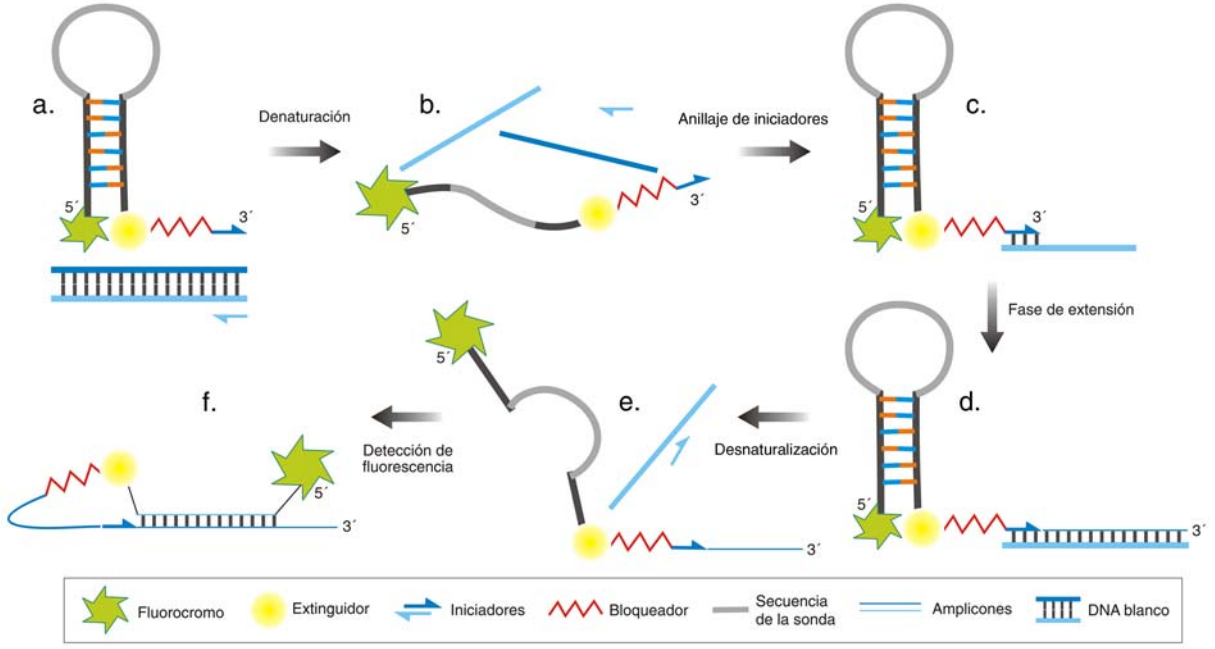


FIGURA 4.
Sondas escorpión.
De a-f, dinámica de la sonda escorpión en la PCR; luego de la extensión, el elemento de la sonda complementaria se une en la misma hebra de DNA y de esta forma se emite la señal fluorescente.

Sondas de hibridación

En este sistema cuatro oligonucleótidos son usados, dos iniciadores y dos sondas (Figura 5). Las dos sondas de hibridación poseen sólo un marcador (fluorocromo aceptor y donador). Las secuencias de las dos sondas son seleccionadas de tal forma que hibriden en la secuencia blanco en forma consecutiva provocando que los dos fluorocromos estén muy cerca y generen FRET. El fluorocromo aceptor en una de las sondas transfiere energía, permitiendo que la otra libere fluorescencia en una longitud de onda diferente. La cantidad de fluorescencia liberada es directamente proporcional a la cantidad de DNA blanco generado durante la PCR.

SYBR Green I

Este cromógeno cuando se incorpora a la cadena doble del DNA emite fluorescencia. Su ventaja está en poder ser usado con cualquier par de iniciadores. Sin embargo, su especificidad disminuye debido al riesgo de amplificar productos inespecíficos en la PCR.

Estandarización y análisis de la técnica

Cuantificación

Con la adición de controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de DNA (curva patrón), se puede cuantificar la concentración inicial de la secuencia blanco en la muestra, durante la amplificación. Este procedimiento se da por el registro del incremento de fluorescencia en cada ciclo, los datos son graficados en curvas de cinética para cada uno de los controles. Consecuentemente, se puede controlar la amplificación de las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia es menos importante. Para cada muestra el equipo calcula el número de ciclos en los cuales se empieza a detectar un aumento de fluorescencia mayor con respecto a la señal inicial. El ciclo donde se detecta el aumento se le denomina punto de corte (Cp, crosspoint) o ciclo umbral (Ct, threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial del DNA blanco presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus Cp correspondientes, se grafica una curva patrón. En ésta es posible interpolar los valores de los Cp de cada muestra problema e inferir la concentración de DNA inicial.

Análisis de curvas de disociación

Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas después de la PCR para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación es posible determinar el *Tm* de los amplificados para comprobar su especificidad. Igualmente, permite el análisis de mutaciones puntuales que pueden ser abordadas de diferentes maneras. Un primer enfoque consiste en el uso de sondas complementarias al DNA blanco que presenten y no presenten la mutación; de esta manera, en el momento de la hibridación de las sondas la variante presente tendrá una mayor estabilidad en la muestra, reflejándose en un mayor *Tm*. Las diferencias entre las temperaturas medias de anillaje de las sondas permitirán discriminar perfectamente entre el DNA tipo silvestre y el que presente la mutación.

Normalización

La PCR en tiempo real requiere que se hagan correcciones de las variaciones experimentales en los procesos tanto de cuantificación como de la reacción en general. Diferencias en la eficiencia de la transcriptasa reversa, en el caso de la cuantificación de RNA, darán como resultado diferencias en la cantidad de DNA copia (cDNA) que no corresponderá a la cantidad inicial de RNA. Adicionalmente, debido a la naturaleza exponencial de la amplificación, diferencias menores en la concentración darán

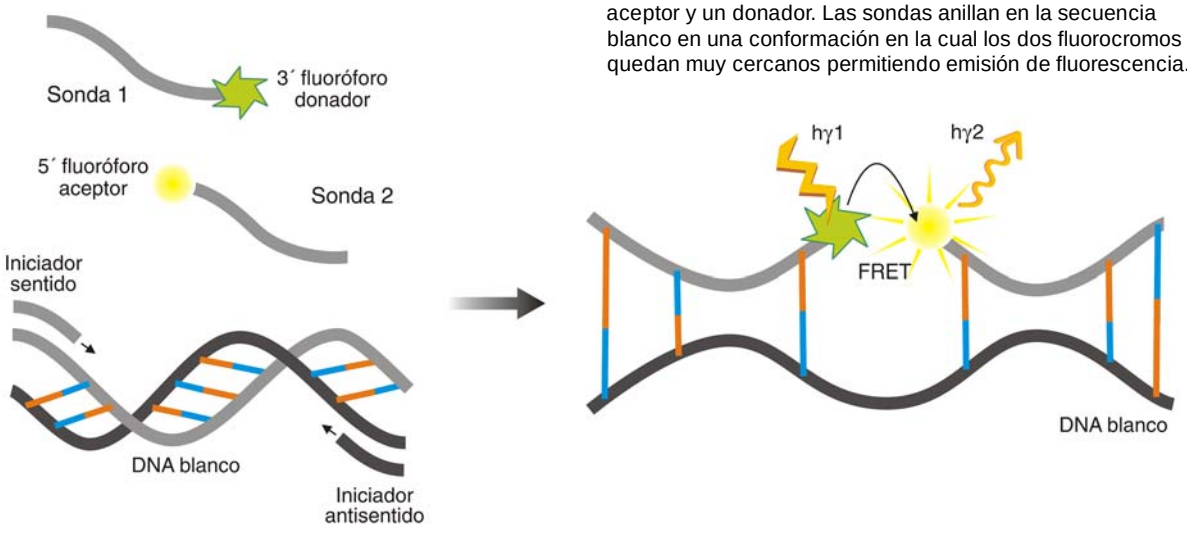


FIGURA 5.
Sondas de hibridación.
Consta de dos sondas marcadas con dos fluorocromos, un aceptor y un donador. Las sondas anillan en la secuencia blanco en una conformación en la cual los dos fluorocromos quedan muy cercanos permitiendo emisión de fluorescencia.

como resultado diferencias significativas. Sin embargo, este inconveniente es menor, debido a que la cuantificación se basa en la medición de parámetros al inicio de la fase exponencial de la amplificación.

La normalización en referencia a un gen constitutivo es actualmente el método más aceptado para corregir las variaciones menores. Un gen constitutivo ideal debería ser expresado a un nivel invariable entre los diferentes tejidos del organismo, en todas las etapas del desarrollo y no debe ser afectado por tratamientos experimentales. Los genes constitutivos más utilizados son el gen de la β-actina, el gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y rRNA (RNA ribosomal), entre otros. Se debe tener en cuenta que la escogencia del gen constitutivo óptimo es dependiente del diseño experimental utilizado para obtener resultados reproducibles.

Discriminación alélica

Los procesos de discriminación alélica pueden abordarse con un sin número de técnicas que pueden ir desde las PCR-RFLP (del ingles Polymerase Chain reaction- restriction fragment long polymorphisms) hasta la secuenciación automática de fragmento de DNA que contienen la variante (Capítulo 43). Sin embargo por razones didácticas, este capítulo se enfocará en la discriminación alélica, basada en ensayos con sondas marcadas por fluorocromos y ensayos 5' nucleasa.

El uso de sondas marcadas con fluorocromos en su extremo 5', permite combinar las técnicas de PCR y detección de alelos en un solo paso, utilizando un equipo de PCR en tiempo real.

Principio del método

Al igual que lo descrito previamente para la PCR en tiempo real convencional, la discriminación alélica parte de la inclusión de dos iniciadores de secuencia específica que localizan e incluyen el fragmento de DNA que contiene la variante de interés, luego de que estos iniciadores se anillen en la secuencia blanco y comiencen la amplificación, una sonda específica, igualmente presente en la reacción, hibridará sobre la secuencia de DNA que posee la variación durante los pasos de anillaje y extensión de la PCR. Este proceso es llevado a cabo por la enzima *Taq* DNA polimerasa, la cual encuentra la sonda hibridada; esta sonda es cortada por la actividad de 5' exonucleasa de la enzima *Taq* DNA polimerasa, pero este corte ocurre únicamente si la sonda es totalmente complementaria e hibridó específicamente sobre el DNA blanco. Luego de que se da este proceso, la emisión de fluorescencia, regulada por el extinguidor, permitirá detectar el tipo de secuencia específica para cada alelo, gracias a la sonda marcada (Figura 6).

Detección de alelos

Este método se utiliza para sistemas polimórficos bialélicos, en los cuales cada alelo será identificado por una sonda específica, cada una de ellas marcada con un fluorocromo reportero diferente en su extremo 5' y un extinguidor en el extremo 3'. La incompatibilidad de una base entre la sonda y el DNA molde, reducirá la eficiencia de hibridación de la sonda y la liberación del reportero y el extinguidor, por lo cual en las reacciones que hay incompatibilidad no será posible detectar la emisión de fluorescencia, mientras que en las sondas que hibriden un 100% con el DNA molde, la actividad 5' exonucleasa de la enzima permitirá liberar el reportero del extinguidor y desarrollar la emisión de fluorescencia, lo cual se considerará una reacción positiva para ese alelo, identificado por la longitud de fluorescencia emitida para el fluorocromo específico, utilizado en la reacción.

El ensayo para discriminación alélica se puede llevar a cabo a través de la tecnología TaqMan, en la cual se tiene

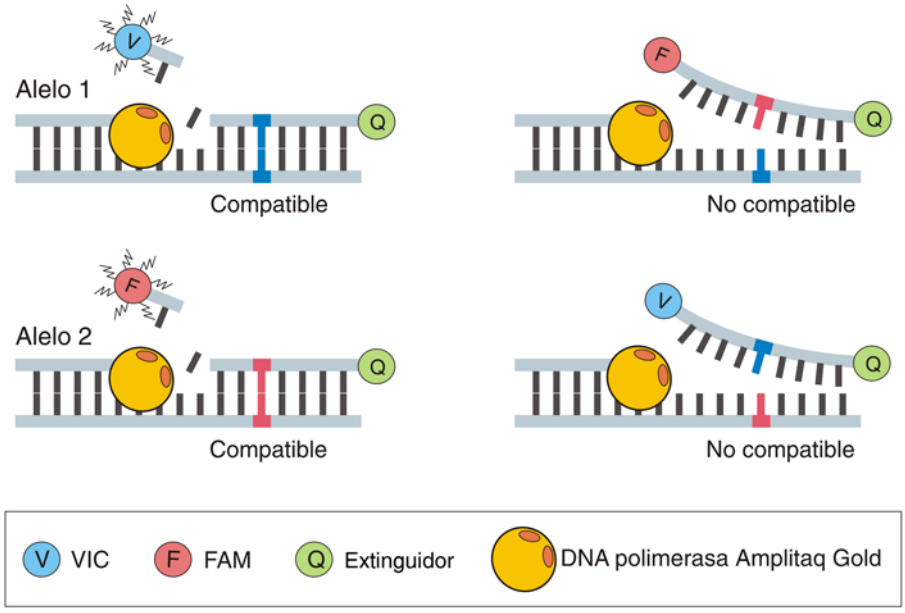


Figura 6.
Diseño experimental de un ensayo de discriminación alélica con sondas marcadas con fluorocromos.
La presencia de una incompatibilidad entre la sonda y la secuencia blanco desestabiliza a la sonda durante la fase de extensión, reduciendo la eficiencia del corte de la misma. Los posibles resultados son los siguientes: señal VIC únicamente (homocigoto para el alelo 1); señal para FAM únicamente (homocigoto para el alelo 2); Las dos señales (heterocigoto).

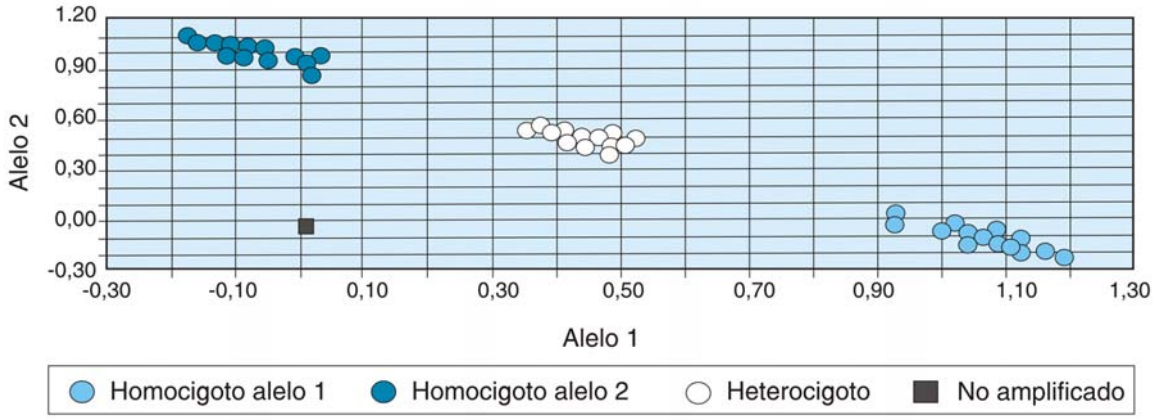


FIGURA 7.
Gráfica de resultados de la prueba de discriminación alélica.
En la parte superior izquierda se pueden observar los individuos homocigotos para el alelo 1, en la parte media de la gráfica los individuos heterocigóticos y en la parte inferior derecha, los individuos homocigotos para el alelo 2.

la mezcla estándar de reacción para PCR en tiempo real, que incluye el buffer para la enzima *Taq* DNA polimerasa, la enzima *Taq* DNA polimerasa con su fragmento Klenow, la mezcla de nucleótidos y el cofactor ($MgCl_2$). A esta mezcla se le adiciona el sistema de iniciadores y sondas marcadas, que corresponden a un par de iniciadores secuencia específica y las dos sondas de discriminación alélica, las cuales van marcadas en forma diferencial con los fluorocromos reporteros correspondientes.

Dado que la reacción es llevada a cabo en una misma mezcla para ambos alelos, el incremento en la emisión de fluorescencia de uno de los reporteros indicará una señal de homocigosidad para esa muestra, mientras que un incremento de fluorescencia en ambos reporteros, dará cuenta de una reacción de heterocigosidad. Los datos arrojados de las emisiones de fluorescencia son interpretados por medio de un programa de cómputo, cuyo proceso se traduce en un código de puntos que representan cada una de las muestras analizadas, esparcidos sobre un plano, en el cual las coordenadas del eje X y Y corresponden a cada uno de los posibles alelos del sitio polimórfico (Figura 7).

Para obtener los resultados generados por esta técnica generalmente los programas de computadora llevan a cabo tres análisis separados.

TABLA 1. **Características del diseño y selección de sondas e iniciadores para discriminación alélica.**

Iniciadores	Sondas
%GC en un rango de 30-80%	
No incluir secuencias con más de tres G consecutivas	
Tm de 58-60 °C	*Tm* de 65-67 °C
Tanto el iniciador sentido (5') como el antisentido (3') deben estar lo más cerca posible a la sonda, pero sin traslaparse.	No debe contener G en el extremo 5'.
El contenido de G o C en el extremo 3' debe ser menor de 2.	La secuencia inicial debe contener más C que G.

1. Análisis de multicomponentes, en el cual se determina la contribución de cada fluorocromo a la fluorescencia total detectada.
2. La normalización de la emisión de fluorescencia, frente a la emitida en la reacción del control negativo, carente de DNA para cada alelo, y el control positivo para el alelo 1 y el alelo 2.
3. Cálculo de emisión de fluorescencia por cada alelo, en cada reacción.

Diseño de una reacción de PCR en tiempo real para discriminación alélica

La clave del éxito en este tipo de reacciones corresponde a un adecuado diseño de las sondas y los iniciadores como se observa en la Tabla 1. Otra clave es el tamaño del amplificado, ya que la reacción es mucho más efectiva con productos entre 70 y 150 pb. No obstante, amplificados de mayor tamaño pueden ser trabajados, pero necesitarán una mejor estandarización.

Aspectos críticos de la discriminación alélica

Los efectos de la complementariedad total o parcial de las sondas pueden generar falsos positivos ya que una sonda con incompatibilidades puede alterar las fuerzas termodinámicas que se generan al tratar de hibridar la sonda que no es 100% compatible, esto conlleva a un gasto de energía y por tanto a una alteración en la emisión de fluorescencia basal.

La *Tm* puede verse afectada, ya que una sonda no complementaria, tendrá una *Tm* mucho más baja que la complementaria 100%. Por tanto, es crítico establecer la *Tm* óptima para ambas sondas y para los iniciadores, sin que haya entrecruzamiento de sondas.

Las reacciones para este tipo de prueba se dan en condiciones de competencia entre sondas, ya que ambas tienen secuencias muy similares y están en el mismo tubo de reacción, por tanto hay que determinar muy bien las concentraciones de las sondas en la reacción, tratando de que

haya igual número de moléculas disponibles para cada una de ellas.

Basados en el principio de la técnica hay que tener en cuenta que la sonda puede comenzar a despegarse del DNA molde, antes de que la enzima cumpla con su actividad de nucleasa, principalmente en aquellas sondas con incompatibilidades. No obstante, este desprendimiento no involucra un corte, por lo cual la emisión de fluorescencia puede no ser clara o no llevarse a cabo y el resultado de la reacción será interpretado como una reacción carente de emisión.

Finalmente, si las condiciones de amplificación e hibridación no son estrictamente controladas, las sondas pueden hibridar en sitios no específicos generando emisión de fluorescencia no específica, luego de que la enzima *Taq* DNA polimerasa la fragmente.

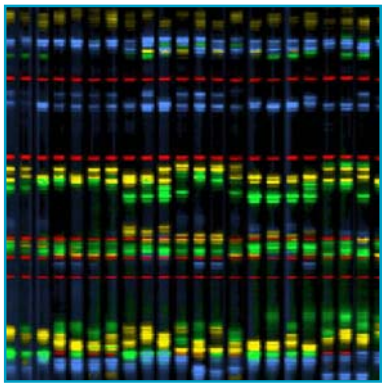
Lecturas recomendadas

1. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol 2002;30: 503-512
2. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004 ;22:299-304
3. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods 2001;25:386-401
4. Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. Plant Cell Rep 2004;23: 263-71
5. Mhlanga MM, Malmberg L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. Methods 2001;25:463-71
6. Solinas A, Brown LJ, McKeen C, et al. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. Nucleic Acids Res. 2001;29:E96.
7. PROLIGO. FLuorescent probes for Real-Time Quantitative PCR. www.proligo.com
8. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genetic analysis: Biomolecular Engineering. 1999;14: 143-149
9. Sevall JS. Rapid allelic discrimination from real-time DNA amplification. Method 2001; 25:452-455
10. Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphism. Ann Rev Hum Genet 2001; 2: 235-258
11. Applied Biosystems. Allelic Discrimination using the 5' nucleae assay. 2000; www.appliedbiosystems.com

43

SECUENCIACIÓN

Paula A. Correa
John Castiblanco



Los esfuerzos para resolver la secuencia de los ácidos nucléicos empiezan a darse a partir de los años 70 y hoy son el pilar del proyecto del genoma humano y gran parte de la genómica que se realiza. Los métodos de secuenciación han evolucionado a través del tiempo, empezando por el método químico de Maxan y Gilbert y siguiendo con el método enzimático de Sanger, que originó la secuenciación automatizada que en la actualidad se utiliza con mayor frecuencia y que ha permitido disminuir los costos y aumentar la eficiencia de la técnica, conservando el principio del método. En el presente capítulo se resumirán los diferentes métodos y las consideraciones básicas para su realización y análisis.

Contenido

Métodos de secuenciación
- Método químico
- Método enzimático
- Automatización de la secuencia

Introducción

La evolución genómica tuvo su apogeo en el año 2000 y está basada en los aportes de cuatro investigadores; Maxan y Gilber, quienes desarrollaron en los años 70 el método químico de secuenciación de DNA; luego Frederick Sanger, quien en 1977 perfeccionó el método enzimático de secuenciación; y por último Leroy Hood, quien junto a sus colegas, Michael Hunkapiller y Lloyd Smith, en 1986, modificaron el método de Sanger.

El método enzimático de Sanger consiste en la adición de nucleótidos modificados (2',3'- dideoxinucleótidos trifosfatos), cuya incorporación a una cadena de DNA creciente genera la terminación de la extensión del DNA. Este método se lleva a cabo *in vitro*, gracias a una reacción de PCR, en la cual se extiende una sola cadena de DNA a partir de un iniciador (primer) específico. Este iniciador o los nucleótidos modificados son marcados con un material radioactivo. Cuatro reacciones de extensión se llevaban a cabo por separado y en paralelo, en cada una de las cuales había un dideoxinucléotido diferente, bien fuera dideoxi-A, dideoxi-T, dideoxi-G o dideoxi-C. El producto de las cuatro reacciones de extensión podía ser visualizado en un gel de poliacrilamida de alta resolución, en el cual se evidenciaban cuatro líneas, cada una de ellas para cada nucleótido, encargadas de revelar la secuencia del DNA.

La propagación de esta técnica en un principio fue bastante laboriosa y sólo permitía resolver secuencias cortas de 100 a 300 bases al tiempo, además debía ser leído e interpretado manualmente, lo cual podía introducir errores a la técnica; no obstante, quienes perfeccionaron luego la técnica, en forma automatizada, simplificaron el proceso, al reemplazar el material radioactivo por el marcaje con fluorocromos, así, cada dideoxi-nucleótido terminador es marcado con un fluorocromo diferente, que generalmente corresponde a un color amarillo, rojo, verde y azul. Las pruebas pueden combinarse todas en una sola reacción, optimizando el espacio del gel. Actualmente, la técnica continúa mejorándose y ahora se ha llevado a la automatización completa, en la cual la emisión de la fluorescencia es detectada por un rayo láser y la resolución de la secuencia se hace a través de un gel inmerso en un capilar. Los resultados son interpretados utilizando un programa de informática. Los equipos utilizados para desarrollar la secuencia automatizada tienen la capacidad de resolver hasta 4.800 bases de secuencia por día.

Métodos de secuenciación

Método químico

Este procedimiento fue uno de los más usados, pero hoy está siendo desplazado por el método enzimático y automatizado. Esta metodología, basada en la hidrólisis química, es aplicable a fragmentos de DNA hasta de 250 nucleótidos. Se ha denominado método de Maxan y Gilbert y consiste en tres pasos:

1. *Marcaje de la sonda:* se puede realizar a partir de un DNA de doble cadena o de cadena sencilla, generado del DNA genómico de cualquier organismo, y obtenido por corte enzimático o cualquier otro proceso de fragmentación selectiva. Este paso consiste en el marcaje de uno de los extremos de la cadena de DNA, utilizando la enzima polinucleotido quinasa con ATP radioactivo para el extremo 5'. Pueden usarse, de igual manera, fluorocromos para marcar el extremo 3' de la cadena.
2. *Modificación de las bases y fragmentación del DNA:* esta es la etapa más importante; en ella se busca generar fragmentos de DNA de cadena sencilla, marcados en uno de sus extremos (dependiendo del tipo de marcación) y de tamaños variables, cuyo nucleótido final sea conocido. Así, el tamaño de la hebra final indicará el orden de la secuencia, de acuerdo con el último nucleótido.
   Este proceso se lleva a cabo por la utilización de compuestos químicos que generan rupturas específicas según la base que conforme el nucleótido.
   La reacción debe ser llevada a cabo en cuatro tubos diferentes, en el caso de guanina, se adicionaría dimetil-

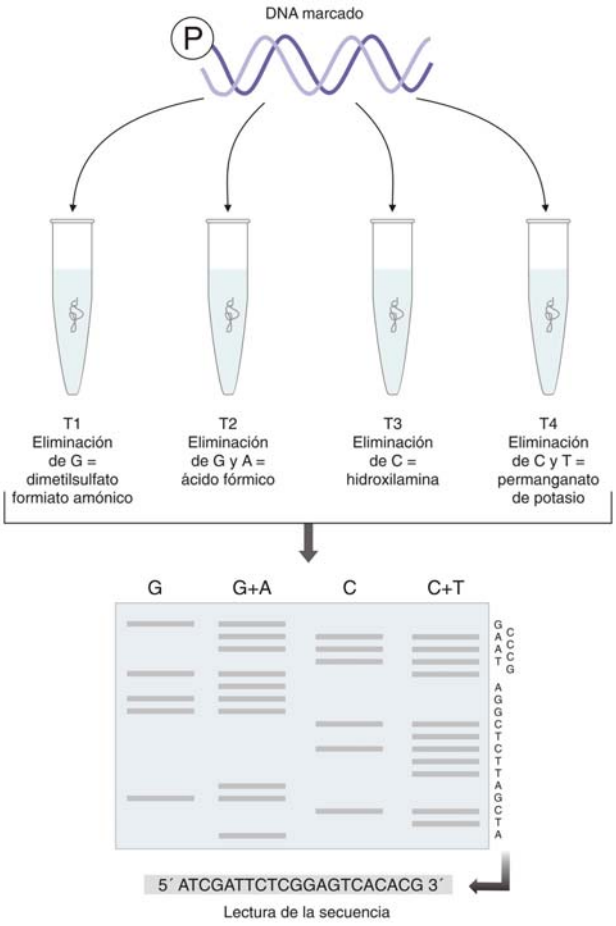


FIGURA 1.
Secuenciación química o método de Maxan y Gilbert.
(Adaptada de Luque J, Herráez A. Secuenciación del genoma y proyectos genoma. 2001)

sulfato al 1% y formidato de amonio 50 mM. Estos compuestos mutilan la guanina y generan un rompimiento de la cadena de DNA en todos los sitios donde esté presente esta base. Para la eliminación de guanina y adenina, indiscriminadamente se utiliza ácido fórmico al 80%. En el caso de la citosina se emplea la hidroxilamina 4 M y altas concentraciones de sales y para la eliminación de citosinas y timinas indistintamente se emplea el permanganato de potasio al 0.1M; igualmente, con alta concentración de sales.

Las reacciones químicas que se generan en los tres tubos, deben realizarse con un estricto control de tiempo, temperatura y concentraciones tanto de los compuestos químicos como de las moléculas de DNA.

3. *Separación de los fragmentos y análisis:* esta es la etapa final del procedimiento y consiste en establecer la secuencia de la cadena de DNA, utilizando geles de poliacrilamida de alta resolución por el método de electroforesis. La secuencia final es resuelta por la migración de los fragmentos de DNA, según su tamaño, dependiendo de la base sobre la cual se haya generado el corte químico (Figura 1).

Método enzimático

Este es el método desarrollado por Sanger, y es el más utilizado para la secuenciación a gran escala. No emplea la fragmentación del DNA, sino que se basa en la interrupción controlada de la síntesis *in vitro* de una hebra complementaria al DNA de interés. Esta síntesis es catalizada por una polimerasa, a lo que se debe el nombre del método. Para la secuenciación enzimática hay que evitar la actividad 5'-exonucleasa que poseen la mayoría de polimerasas comerciales y además seleccionar la enzima de mayor fidelidad.

Para el método enzimático se emplea un iniciador específico, diseñado para anillar en el extremo 3' de la cade-

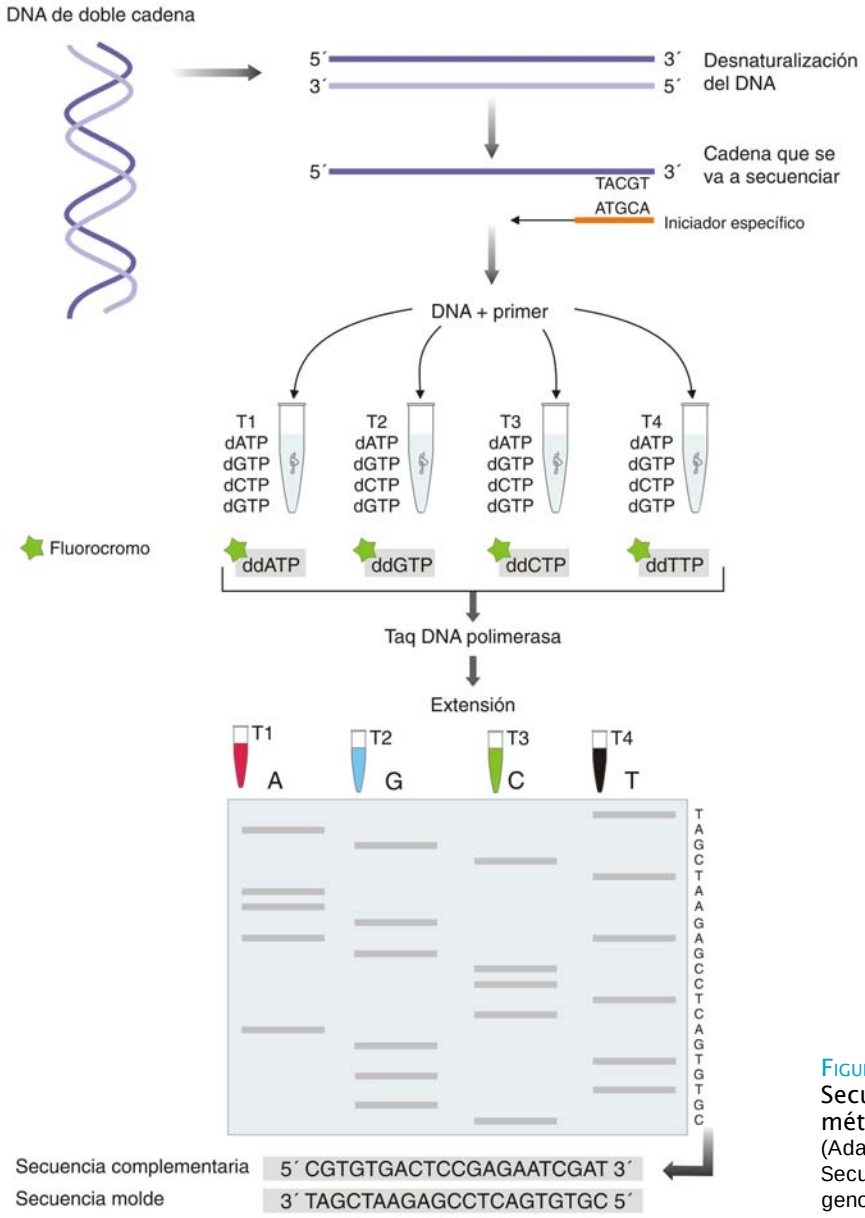


FIGURA 2.
Secuenciación enzimática o método convencional de Sanger.
(Adaptada de Luque J, Herráez A. Secuenciación del genoma y proyectos genoma. 2001)

na de DNA que se desea secuenciar. Adicional a este iniciador, deberán utilizarse dideoxinucleótidos (ddNTPs), análogos estructurales de los desoxinucleótidos (dNTPs), que generan la parada de la síntesis de la cadena de DNA una vez se incorporan. Los dNTPs también deben adicionarse a la mezcla, en igual proporción que los ddNTPs, para que compitan entre ellos, en la reacción, durante el paso de extensión. Ya que la polimerasa incorpora dNTPs como sustrato a la cadena de DNA, por analogía, tiene la misma probabilidad de incorporar ddNTPs, pero en el sitio donde éste se incorpore, pararía la cadena, ya que se genera un extremo 3'OH que impide la formación del enlace fosfodiester con el siguiente nucleótido (Figura 2).

Para el método enzimático, la separación de los fragmentos y el análisis de la secuencia, sigue el mismo principio usado en el método químico.

Automatización de la secuencia

La posibilidad de usar fluorocromos distintos para cada nucleótido incorporado en una reacción de secuencia (Tabla 1), permitió que el método enzimático de Sanger pudiera automatizarse, leyendo al tiempo las cuatro reacciones que antes se llevaban a cabo por separado. Además, la lectura de la fluorescencia es un proceso que puede hacerse en forma continua, mientras la electroforesis, bien sea en gel o en capilar (Figura 3), está en proceso. En este método las moléculas de DNA de menor tamaño pasaran más rápido por el filtro de fluorescencia y emitirán una lectura a una longitud de onda específica, que permita determinar el nucleótido al cual corresponde. Este método aumenta mucho el tamaño del fragmento de DNA que se puede secuenciar en un solo experimento y permite el análisis automatizado de las secuencias (Figura 3).

Tabla 1. Fluorocromos disponibles para la secuenciación automática.

Sigla	Nombre	l ex(nm)	lem (nm)	Color emitido
FAM	(5 o 6)- Carboxifluoresceína	494	518	Amarillo
JOE	(5 o 6)- Carboxi-4',5-dicloro-2'7'-dimetoxifluoresceína	522	550	Rojo
TAMRA	(5 o 6)- Carboxitetrametilrodamina	555	580	Morado - Negro
ROX	(5 o 6)- Carboxi-X-rodamina	580	605	Azul - Verde

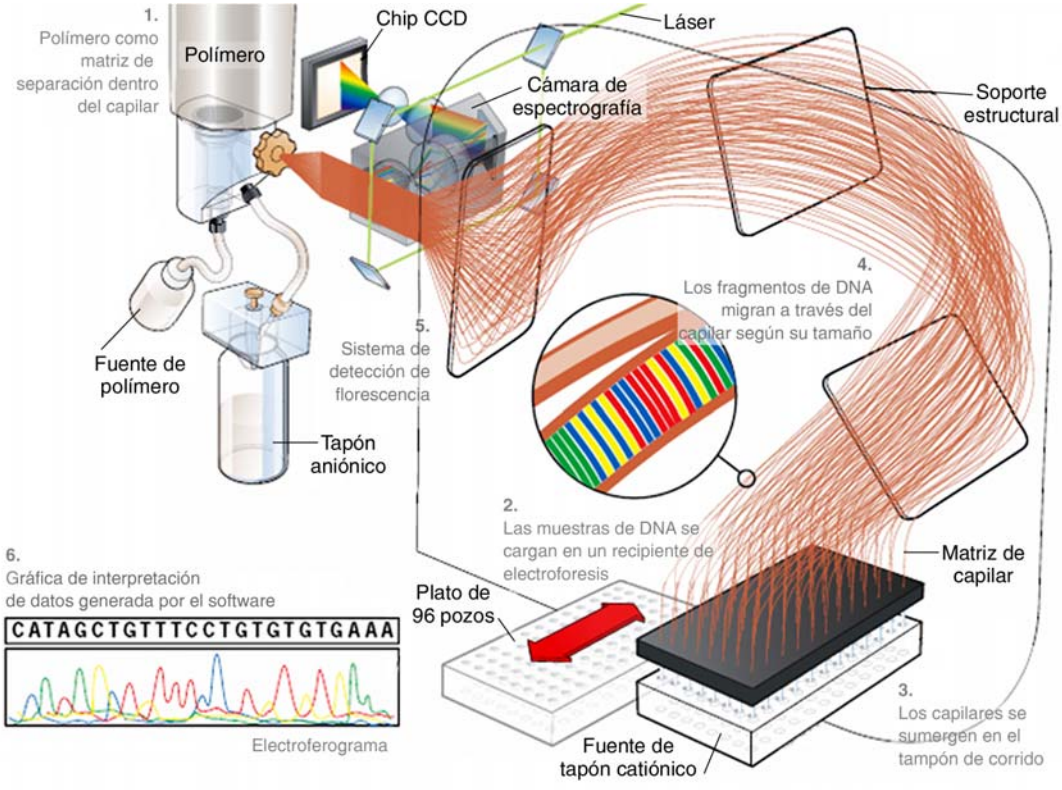


Figura 3.
Secuenciación automática.
Esquema de la secuenciación automática, utilizando un equipo para electroforesis de 96 capilares, el cual detecta la emisión de fluorescencia a través de una cámara de espectrofoto-metría, cuya longitud de onda es registrada por un software y traducida en un electroferograma. (Adaptada de Perkel BJ. The Scientist. 2004)

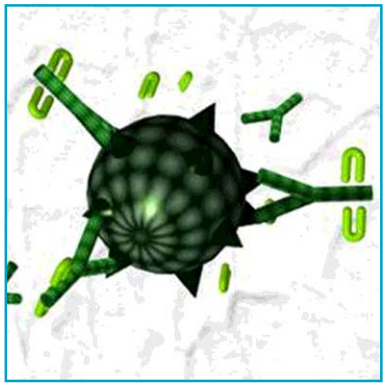
Lecturas Recomendadas

1. Luque J, Herráez A. Secuenciación del genoma y proyectos genoma. En: Luque J, Herráez A editores. Biología Molecular e Ingeniería Genética, conceptos técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid. Harcourt S.A. 2001: 231-241
2. Perkel BJ. An automated DNA sequencer. The Scientist 2004; 27:40-41

44

ELISA

Paula A. Correa
John Castiblanco



La ELISA es un inmunoensayo en fase sólida en el cual se puede cualificar o cuantificar proteínas, gracias a su capacidad de absorción sobre diferentes fases sólidas como es el caso de membranas o microplatos. Es una técnica sensible, sencilla y específica, que permite detectar bien sean antígenos o anticuerpos de una amplia variedad de muestras biológicas. Es usada tanto como método diagnóstico como de investigación. Gracias al marcaje enzimático y a la reacción antígeno-anticuerpo es posible detectar y cuantificar un analito de interés, por medio de reveladores enzimáticos, que generan una reacción de color que permite ser cuantificada por técnicas visuales o de espectrofotometría. Esta prueba permite traducir los valores de densidad óptica, en concentración, gracias a los análisis de resultados, basados en la regresión linear.

Contenido

Principio del método
Tipos de ELISA
Procedimiento, materiales y reactivos
Control de calidad
Análisis de resultados

ELISA

La prueba de inmuno-absorción ligada a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA, es una técnica sensible, versátil, precisa y reproducible, de carácter cuantitativo y cualitativo, para la determinación de antígenos (Ag) o anticuerpos (Ac) en una muestra biológica. La ELISA es un inmunoensayo ampliamente utilizado como herramienta diagnóstica y de investigación biológica. Esta técnica ha sido modificada y adaptada para múltiples aplicaciones desde su generación hace más de 30 años. La ELISA se ha utilizado como prueba en el estudio de enfermedades infecciosas, epidemiología, endocrinología e inmunología, entre otros. El desarrollo de anticuerpos específicos para las pruebas y los reactivos cada vez más adecuados han ido revolucionando las facilidades y aplicaciones de la técnica, en particular, han agilizado los procedimientos haciéndolos más cortos, de mayor reproducibilidad y mejor sensibilidad, permitiendo evaluar mejor las reacciones antígeno-anticuerpo.

La ELISA fue planteada por Engall y Perlmann y desarrollada por Weemen y Schuurs en los años 70. La prueba consiste en un inmunoensayo en fase sólida. Esta técnica ocupó el lugar del Radio Inmuno Ensayo (RIA), que fue desarrollado en muchos laboratorios, previo a la aparición de la ELISA. Igualmente, desplazó la inmunofluorescencia y la aglutinación, todo gracias a las posibilidades de automatización y a la capacidad de analizar un gran número de muestras al tiempo. Además, la ELISA utiliza las propiedades de las enzimas para ampliar y revelar una reacción de antígeno-anticuerpo generada en concentraciones de pico o atomoles.

Principio del método

El principio básico de la técnica de ELISA es el uso de un Ag o Ac conjugado con una enzima, la cual es capaz de reaccionar con su sustrato, generando una reacción de color donde se produce la interacción inmunológica antígeno- anticuerpo. El cambio de color es monitoreado visualmente (cualitativo) o por el uso de la espectrofotometría (cuantitativo), para determinar la cantidad de analito presente en la muestra. Un paso esencial en este tipo de pruebas es la separación de la enzima marcada unida durante la reacción y el marcaje libre o inespecífico que se genera durante la prueba. De igual manera, en el caso de determinación de anticuerpos, puede darse, incluso discriminación y cuantificación de isotipos, dependiendo de la especificidad del antígeno utilizado.

Tipos de ELISA

Hay muchas formas diferentes de diseñar la ELISA y el rango de ensayos que se pueden llevar a cabo. La elección depende de la naturaleza de la muestra, la disponibilidad de reactivos, al igual que la sensibilidad y precisión requeridas para el análisis. En muchas ocasiones no es necesario tener una medida precisa de la concentración de una proteína en la muestra. Bajo ciertas circunstancias es suficiente con una identificación cualitativa (presencia o ausencia) del analito. También, hay otros casos en los que una clasificación como alto, medio o bajo (semicuantitativa), puede brindar información suficiente en un resultado de una prueba. En la mayoría de los casos es necesario determinar cantidades exactas del analito, y esta cantidad se logra con pruebas más estrictas de carácter cuantitativo.

ELISA no-competitiva

Es la variedad de ELISA más usada. Consiste en un inmunoensayo en fase sólida que permite cuantificar la cantidad del antígeno o el anticuerpo presente en una muestra. Este tipo de ELISA tiene dos variantes básicas que involucran la unión del antígeno a la fase sólida o por el contrario, la unión del anticuerpo. La ELISA no-competitiva, en algunos casos puede generar una baja especificidad pero una alta sensibilidad.

Fijación del antígeno a la fase sólida

Estos son los tipos de ensayos más simples, también se conocen como ELISA indirecta o ELISA Sánduche. En esta prueba el Ag es fijado a la fase sólida, bien sea de baja capacidad o alta capacidad, como se tratará más adelante. Luego, la muestra es adicionada y en caso que se genere la unión Ag-Ac, ésta será detectada por la adición de un segundo Ac específico, cuyo isotipo puede ser definido, para identificar así la clase de inmunoglobulina que se unió al antígeno durante la prueba, marcado con una enzima, capaz de unirse al Ac presente en la muestra (Figura 1). Este segundo Ac se denomina anticuerpo de detección, y por lo regular va unido a la biotina, la cual tiene una alta afinidad por la avidina, que permite entonces detectar el complejo anticuerpo de detección-biotina-avidina. Este tipo de ensayo es muy utilizado en el diagnóstico microbiológico y pruebas de autoanticuerpos.

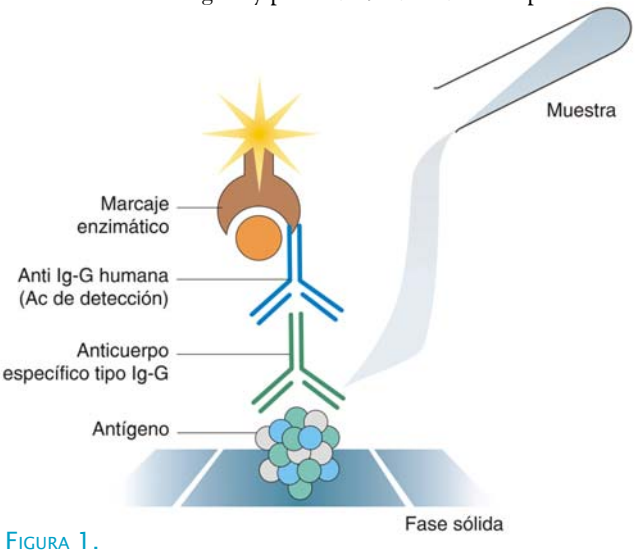


FIGURA 1.
Fijación de un antígeno a la fase sólida por Elisa en sánduche.
La ELISA parte de la base de la detección de un antígeno o anticuerpo fijado a una fase sólida, que se une a un anticuerpo (o antígeno según sea el caso) marcado enzimáticamente, que emite color.

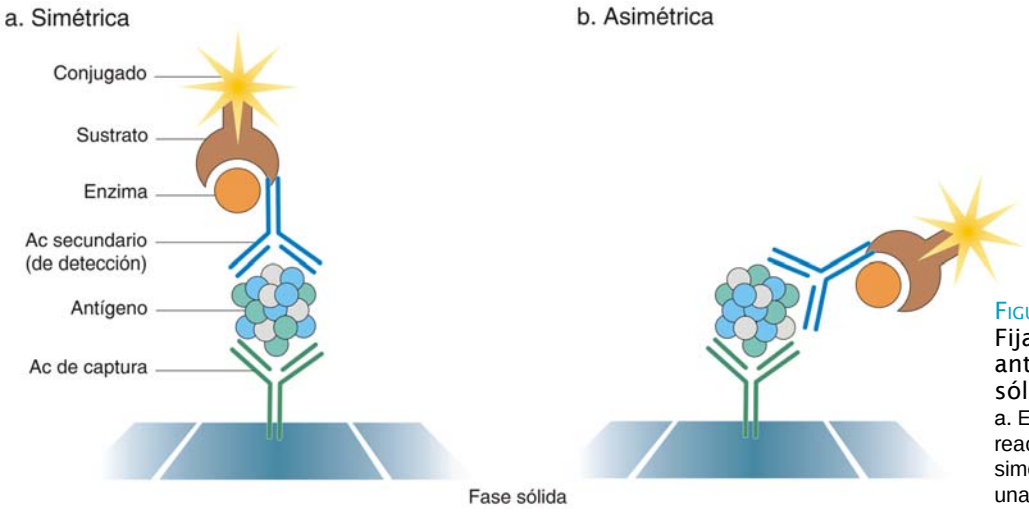


FIGURA 2.
Fijación de un anticuerpo a la fase sólida.
a. Esquema de una reacción de ELISA simétrica. b. Esquema de una reacción Asimétrica.

Fijación del anticuerpo a la fase sólida

Conocida como ensayo de captura, hace referencia igualmente a una ELISA sánduche, en la cual se usan dos anticuerpos, uno que se une a la fase sólida y otro es el anticuerpo marcado. El primero tiene la función de "capturar" el antígeno específico existente en la muestra, y el segundo se une de forma igualmente específica al antígeno, además contiene la marcación enzimática para revelar la reacción bien sea de forma simétrica o asimétrica (Figura 2a y 2b).

Ensayos simétricos: son aquellos en los que el anticuerpo de captura es específico para unirse al Ag, la unión del Ag al Ac es detectada por una segunda adición del mismo Ac de captura, pero ahora marcado enzimáticamente. Los ensayos simétricos utilizan antisueros policlonales, dado que es muy escaso disponer del mismo Ac en forma monoclonal para la captura y que a la vez pueda estar marcado con biotina u otra enzima (Figura 2a).

Ensayos asimétricos: En este tipo de ensayo el Ac de captura y el Ac de detección son diferentes. Éstos son generados a partir de Ac purificados por afinidad y se usan más en combinaciones de Ac monoclonales para la captura y Ac policlonales como detectores. Este tipo de ensayo logra una alta especificidad durante la captura y máxima sensibilidad en la detección, debido al gran número de Ac marcados enzimáticamente disponibles. Dado que el detector es policlonal, éste ofrece la ventaja de poseer múltiples epítopes que pueden interactuar con el Ag y da la posibilidad de un segundo marcaje enzimático (Figura 2b).

ELISA competitiva

La ELISA competitiva, al contrario de la no competitiva, permite hacer un estimativo de la cantidad particular de Ag o Ac, en ocasiones cuando éste no puede ser purificado del medio en el cual se encuentra. Esta ELISA permite obtener resultados de alta especificidad pero muy baja sensibilidad. Igualmente, este tipo de prueba puede ser utilizada para identificar diferentes determinantes antigénicos de una misma molécula, siempre teniendo presente las concentraciones de Ag, Ac y su respectivo competidor, adicionadas a la reacción.

ELISA competitiva para detección de antígenos

El antígeno por este método puede ser medido de dos formas.

i) El antígeno fijado a la fase sólida es el mismo que el antígeno que se mezcla con la muestra y con el anticuerpo específico marcado con la enzima (Figura 3a).
ii) Un anticuerpo es fijado a la fase sólida y se adiciona un antígeno marcado enzimáticamente junto con un

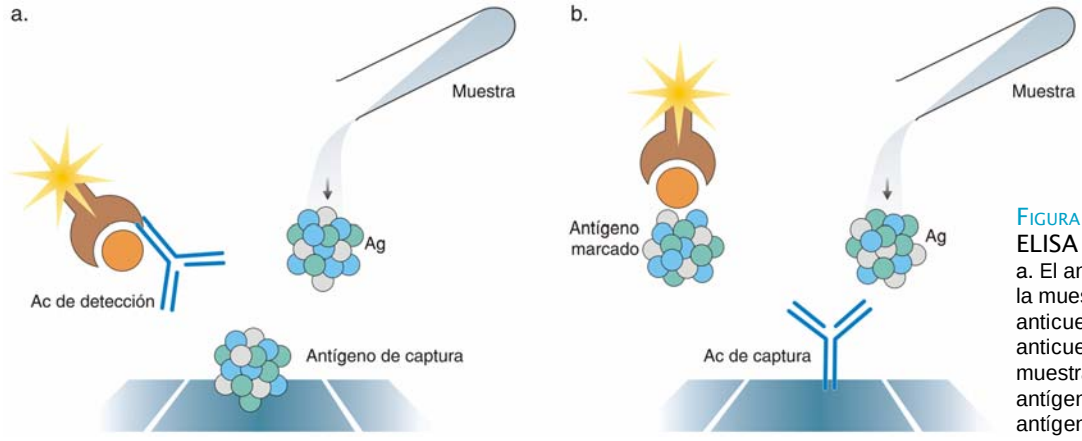


FIGURA 3.
ELISA competitiva .
a. El antígeno presente en la muestra compite por el anticuerpo marcado. b. El anticuerpo presente en la muestra compite por el antígeno marcado con otro antígeno igual.

antígeno igual al marcado presente en la muestra, que puede reaccionar con el anticuerpo de la fase sólida (Figura 3b).

ELISA competitiva para detección de anticuerpos

Este tipo de ensayo es el más utilizado. Se emplea para comparar la especificidad de los anticuerpos en análisis de estructuras antigénicas con anticuerpos monoclonales. Puede desarrollarse de dos formas.

i) En un caso fijar un antígeno a la fase sólida y el anticuerpo presente en la muestra compite con un anticuerpo marcado enzimáticamente por la unión con el antígeno (Figura 4a).
ii) De otra parte, un anticuerpo puede ser fijado a la fase sólida, mientras que el anticuerpo presente en la muestra compite con el anticuerpo unido a la fase sólida por el antígeno enzimáticamente marcado en la reacción (Figura 4b).

Procedimiento, materiales y reactivos

La técnica de ELISA permite su realización bien sea por estuches comerciales, previamente estandarizados y probados o por técnicas puestas a punto en cada laboratorio, que permiten ajustar el método a las necesidades del analista. Estas últimas son de mayor utilización en las áreas de la investigación, mientras que las primeras tienen más aplicación en el diagnóstico clínico. Para ambos métodos los requerimientos son similares y se describen a continuación.

Condiciones de la muestra

Muchos de estos ensayos son utilizados para diagnóstico, por lo cual la muestra más adecuada es el suero, preferiblemente refrigerado y sin presencia de hemoglobina, por procesos de hemólisis, ya que ésta puede generar ruido de fondo durante las reacciones. Igualmente, el exceso de lípidos en la muestra puede causar problemas. El suero utilizado, debe ser manejado en condiciones estériles, para evitar la contaminación bacteriana, que podría interferir con el resultado. Otros tipos de muestras pueden ser utilizadas, tales como fluidos corporales (lágrimas, saliva, líquido céfalorraquídeo, orina) o sobrenadantes de cultivo celular, siempre teniendo en cuenta la manipulación y las condiciones que exige cada muestra en cuanto a la preservación de proteínas antigénicas o anticuerpos.

Fase sólida

El material de la fase sólida es crítico según el tipo de prueba y el objetivo que ésta tenga, por lo cual la fase sólida se ha dividido en dos grandes categorías, basadas en la capacidad de unir proteínas, una es la de alta capacidad y otra la de baja.

Fase sólida de alta capacidad

En esta categoría se clasifican las partículas de agarosa, y los papeles de celulosa y nitrocelulosa. Esta fase puede ser activada con bromuro de cianógeno, el cual les permite fijar una amplia gama y cantidad de proteínas a su superficie. Este método es fácil de realizar y puede ser inhibido por la adición de sales, tales como el TRIS. Esta fase sólida con el antígeno o el anticuerpo unido pueden ser estables durante años, y pequeñas cantidades de proteína son suficientes para obtener una buena reacción.

Fase sólida de baja capacidad

A este tipo de fase pertenecen los materiales de polietileno, los cuales están disponibles en el formato de microplatos, que son los más utilizados. La mayor ventaja de usar esta fase es su capacidad de unir la cantidad suficiente de proteína, de manera homogénea, lo cual disminuye la posibilidad de ruido de fondo durante la absorbancia en la medición, siempre y cuando se regule moderadamente la cantidad de proteína que será fijada en cada pozo. Este material es fácil de manipular y existe una gran variedad de platos, según las necesidades del analista.

Sensibilización

Luego de seleccionar el tipo de fase sólida, la siguiente consideración es la de sensibilizar dicha fase. Consiste en fijar la proteína (Ag o Ac) a la superficie seleccionada. Este paso se puede hacer de manera directa o indirecta.

Sensibilización directa

Esta forma consiste en sensibilizar la fase sólida de manera pasiva, por adsorción directa de la proteína a la superficie. Las proteínas difieren en su capacidad de

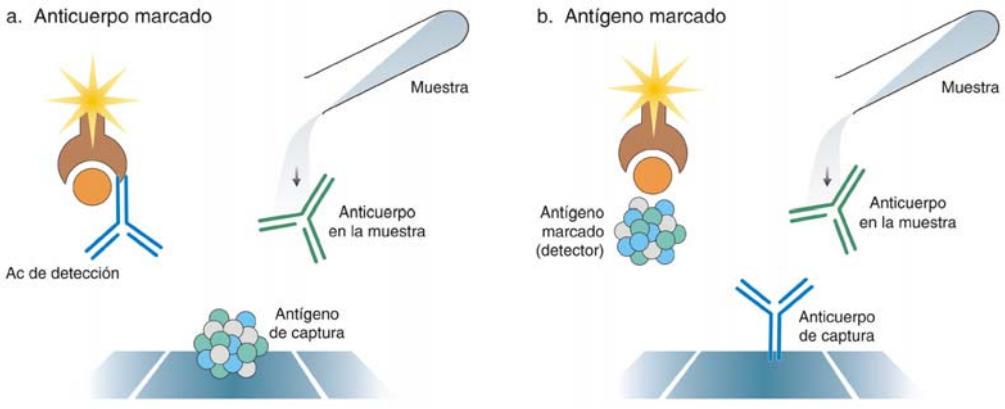


FIGURA 4.
Elisa competitiva.
a. Detección de un anticuerpo en una muestra por competencia con un anticuerpo marcado.
b. Detección del anticuerpo presente en la muestra por competencia con un antígeno marcado.

adsorberse, por lo cual se hace necesario ajustar el método según las necesidades y características de cada ensayo. La eficiencia de esta sensibilización dependerá de dos factores críticos:

i) La integridad de la proteína que se está utilizando, ya que no debe estar dañada ni degradada y
ii) La fuerza de unión que está presente en el material de fase sólida. Las proteínas que sensibilizarán esta fase se pueden orientar de forma específica, por ejemplo uniendo los residuos hidrofóbicos de la proteína al plástico de los microplatos, para disminuir la cantidad de determinantes antigénicos que puedan quedar expuestos.

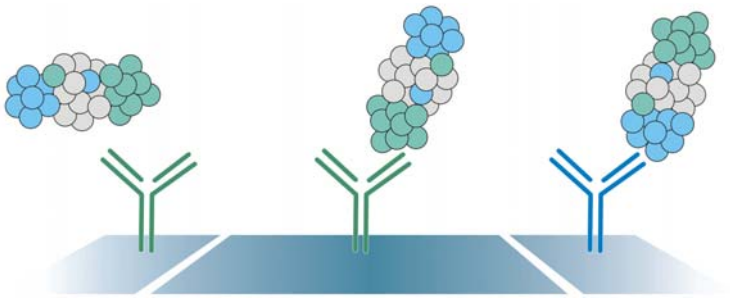


FIGURA 5.
Sensibilización indirecta con antígenos.
La unión al epítope antigénico, determinará la orientación del anticuerpo de captura.

Sensibilización indirecta

Este método utiliza intermediarios para unir la proteína a la superficie seleccionada, por lo que confiere una ventaja en reproducibilidad, sensibilidad y especificidad de la técnica. Esta sensibilización puede hacerse por medio de un antígeno o de un anticuerpo.

Sensibilización indirecta con antígenos

Una de las mejores formas de unir antígenos a la superficie de un plato de ELISA es a través de un anticuerpo (Figura 5). Está técnica tiene la ventaja de aumentar la especificidad del ensayo, ya que los antígenos inespecíficos, no unidos al anticuerpo, no podrán adherirse a la superficie deseada y la estabilidad de la unión del antígeno a la superficie será mucho mejor (Tabla 1). Así mismo, los determinantes antigénicos serán menos afectados y este paso aumentará la sensibilidad de la prueba. En este tipo de sensibilización se pueden utilizar anticuerpos tanto monoclonales como policlonales.

Sensibilización indirecta con anticuerpos

Este método es el menos usado, ya que no muchos anticuerpos tienen la capacidad de unirse a la fase sólida, unir un antígeno y además conservar sitios de enlace para capturar el antígeno de interés, por lo cual la actividad del anticuerpo se pierde en gran proporción. Sin embargo, esta técnica es recomendada en los casos en los que el anticuerpo tenga dificultades para fijarse a la fase sólida, como por ejemplo, la IgG1 humana monoclonal.

Tipos de Ag para sensibilización

Ésta requiere consideraciones especiales, como la naturaleza fisicoquímica de la molécula y su papel biológico. Siempre es preferible utilizar antígenos puros, pero en muchos casos los extractos crudos son la única fuente del material de interés. Las fuentes del antígeno pueden ser muy diversas, como por ejemplo antígenos de superficie celular, para los cuales es necesario fijar la célula completa a la fase sólida. Otra clase es la mezcla de Ags, en el caso de que no se logre purificar la molécula específica; para esta clase de Ags se recomienda la fase sólida de agarosa o la nitrocelulosa. Una forma más de sensibilización con Ags es el uso de péptidos, aislados de la proteína o fabricados sintéticamente.

Tipos de Ac para sensibilización

La sensibilización con Ac puede llevarse a cabo:

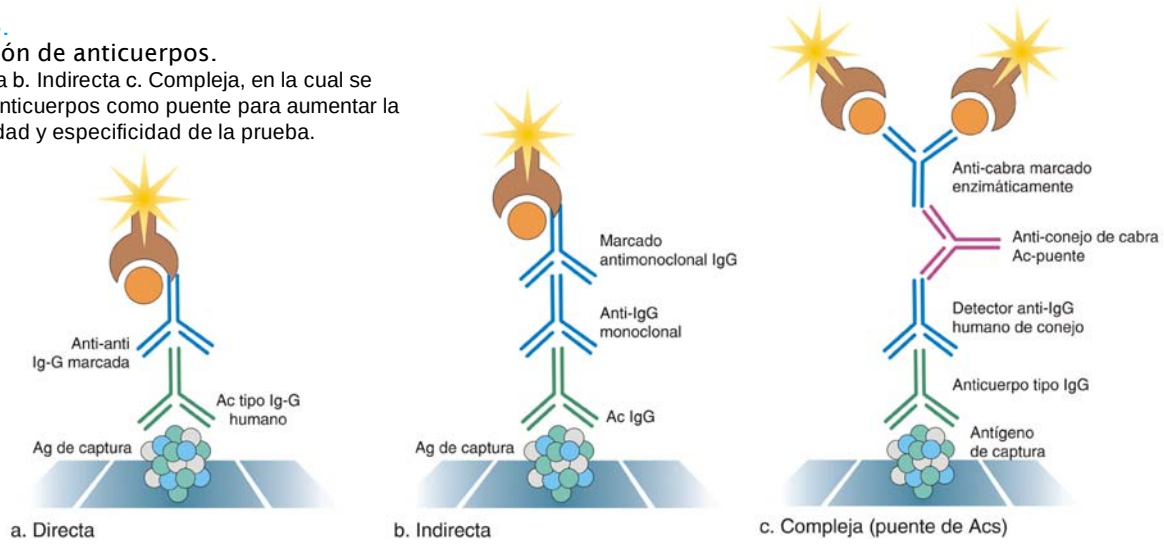
i) con anticuerpos tipo policlonales, éstos pueden obtenerse por absorción; por anti sueros con altos títulos de anticuerpos; por inmunoglobulinas purificadas por afinidad, o por sensibilización con fragmentos F(ab) de los anticuerpos;
ii) con anticuerpos monoclonales, los cuales son más específicos pero más difíciles de obtener, ya que requieren del desarrollo de una respuesta inmune específica, por eso se hacen necesarios métodos como la recolección por ascitis, luego de inocular un animal con el antígeno específico para que genere una clona de linfocitos B productores del anticuerpo; o por sobrena-

Tabla 1. **Porcentaje de disociación de los antígenos unidos a las diferentes fases sólidas en el tiempo.**

	Desprendimiento después de 3 horas		
Tipo de microplato	ng de antígeno unido	ng de antígeno desprendido	% de desprendimiento
A	5	2	40%
B	4	2	50%
B + anti-Pla2	31	0.4	1.3%
C	17	6	35%
D	2	1	50%
E	35	3	9%

Tipos de microplatos: A: polipropileno con fondo redondeado, B: plástico con fondo redondeado, C: polipropileno fondo plano, D: plástico fondo plano, E: Polipropileno fondo plano en frío, Pla 2: adición de anticuerpo antifosfolipasa 2.

FIGURA 6.
Detección de anticuerpos.
a. Directa b. Indirecta c. Compleja, en la cual se utilizan anticuerpos como puente para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba.



dantes de cultivo celular. Sin embargo, las concentraciones obtenidas por estos métodos son muy bajas.

Marcaje enzimático y detección

Las enzimas más utilizadas para la ELISA son la peroxidasa de rábano (HRP del inglés "Horse radish peroxidase"), la fosfatasa alcalina (PA) (AP del inglés Alkaline Phosphatase) y la β-D-Galactosidasa (β-GAL). Cualquiera de estas enzimas es muy eficiente; no obstante, es importante determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura en las cuales éstas actúan y tener en cuenta que su inmovilización con el conjugado puede alterar su actividad.

Detección

En los inmunoensayos un detector es básicamente una molécula que tiene especificidad por el analito presente en la muestra que se desea detectar. El detector puede ser marcado directamente con la enzima, es lo que se conoce como ELISA directa, o puede marcarse indirectamente (ELISA indirecta). El detector, en el caso de la ELISA, puede ser un antígeno o un anticuerpo, pero en todos los casos debe unirse de manera específica a la molécula de interés.

Anticuerpo como detector

El anticuerpo detector puede ser marcado directamente, sobre todo en el caso de que sea un anticuerpo monoclonal, o puede haber un segundo anticuerpo marcado con la enzima. También es posible utilizar anticuerpos como puentes entre el anticuerpo detector y el anticuerpo marcado, combinando sitios de unión al anticuerpo detector, para aumentar la sensibilidad (Figura 6 a,b y c).

Antígeno como detector

Esta modalidad de detección es poco usada y en el caso de la ELISA directa es casi imposible que sea funcional, empero, hay casos en los que se hace necesario. Para ello es recomendable crear un complejo detector (indirecta) en el cual el antígeno esté unido de manera específica a un anticuerpo que contenga el marcaje enzimático o que se utilicen pequeños grupos químicos o haptenos biotinilados, aunque sean menos eficientes en la unión con los antígenos (Figura 7a y b).

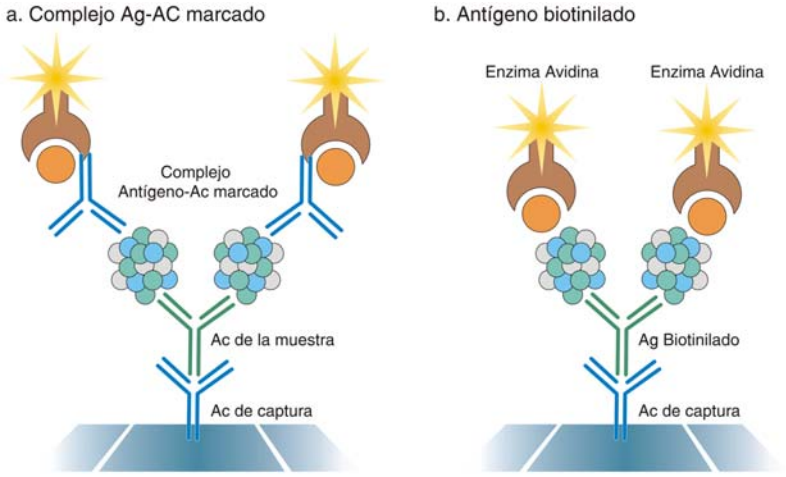


FIGURA 7.
Enzima indirecta para detección de antígenos.
a. Detección a través de un complejo antígeno-anticuerpo marcado. b. Detección a través de un antígeno marcado.

Sustratos

La selección de los sustratos dependerá de la enzima utilizada, de la relación de color que se requiera en la muestra, de la estabilidad del compuesto, la toxicidad y los costos. Para la HRP hay una gran variedad de sustratos disponibles, ya que esta enzima reduce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxida un segundo sustrato. Por lo que cuando se utiliza esta enzima, siempre será necesario adicionar el H_2O_2. Los sustratos más utilizados son el OPD (o-fenilenamina) que absorbe a una longitud a 475 nm; el ABTS (5-ácido aminosalicílico 2,2-azino-di (3-etil-benstiasolin sulfonato-6) que absorbe a una longitud de 414 nm y el TMB (3,3'5,5'-Tetrametilbenzidina). Por su parte, para la PA el sustrato más usado es el NPP (p-nitrofenil fosfato) el cual absorbe a una longitud de 405 nm.

Método de conjugado

Este método es bastante utilizado y busca más que todo acoplar bien la enzima al anticuerpo o antígeno utilizado en la ELISA, favoreciendo la estabilidad de la reacción. El conjugado estará compuesto por la enzima, el antígeno o anticuerpo y un tercer compuesto que puede ser químico, protéico, o por reacciones de alta afinidad como la avidina/biotina (Figura 8).

Control de calidad

Hay varios factores críticos en la calidad y confiabilidad de la prueba, que podrían clasificarse como preanalíticos, analíticos y postanalíticos, como se ve en la Tabla 2. Para poder controlar estos posibles errores es necesario incluir controles positivos y negativos dentro de las pruebas. Un control negativo correspondería a una reacción con tampón fosfato, donde no se adicione la muestra a analizar, para asegurarse de que no se generó una reacción Ag-Ac, y de esta forma poder determinar el ruido de fondo presente en las reacciones. Un control positivo fuerte puede corresponder a una concentración de antígeno o anticuerpo conocida. Además, cada una de las muestras debe ser analizada por duplicado o triplicado, de ser posible. En el caso de que la ELISA sea puesta al punto en el laboratorio, es necesario identificar todas las posibles variables de la prueba y estandarizarlas una a una, hasta que sean las esperadas y además sean reproducibles. De igual manera, debe contarse con una curva estándar de normalización para poder determinar la correlación existente entre la absorbancia del color en la reacción y la concentración de la muestra, como se tratará en el análisis de resultados.

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos en una ELISA pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos, como se dijo antes, según las características del método. Cada uno de los resultados puede expresarse como se observa en la Tabla 3.

En el caso de los resultados cuantitativos, es necesario contar con estándares de medición para la molécula cuantificada que permitan establecer los parámetros numéricos necesarios para el análisis de resultados en la ELISA. Estos parámetros incluyen el punto de corte, la curva de referencia, el límite inferior y los títulos (concentración) de la reacción.

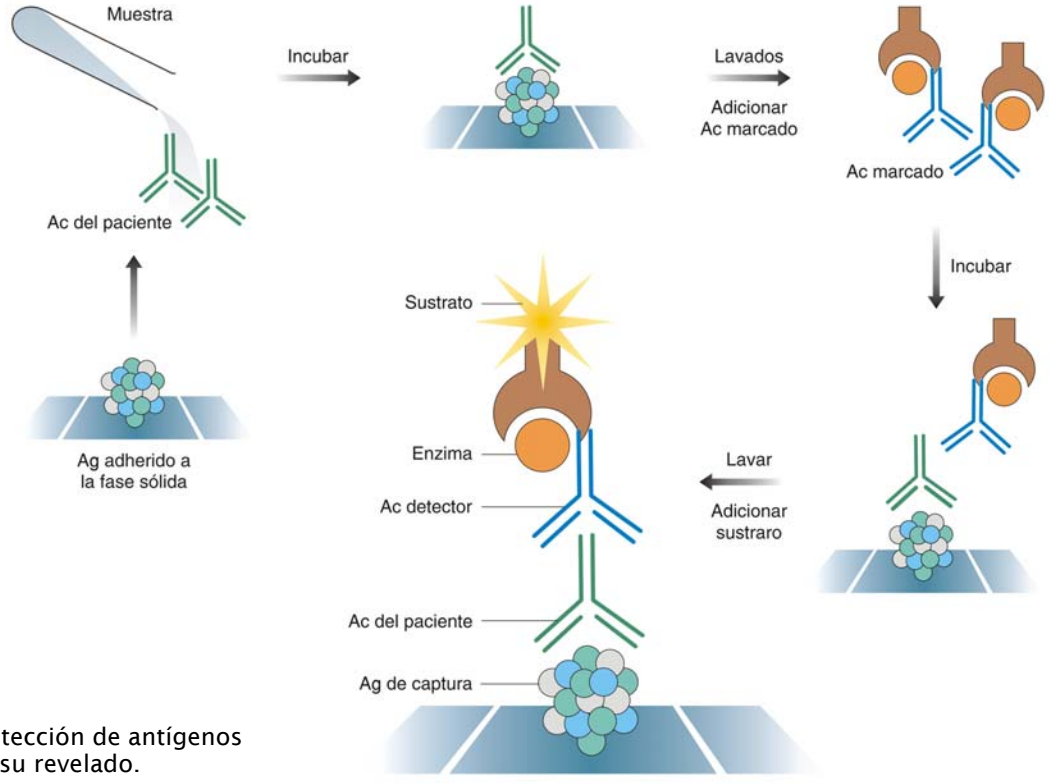


FIGURA 8.
Pasos para la detección de antígenos o anticuerpos y su revelado.

TABLA 2. Factores críticos en el control de calidad para la ELISA.

Fase	Factor	Causa
Preanalítica	Preparación del paciente	Ingesta Alcohol Tabaco Ejercicio
	Obtención de la muestra	Hemolisis Hiperlipidemia Dilución
Analítica	Sensibilización	Baja cantidad de proteína Exceso de proteína fijada Desprendimiento de la proteína
	Reacción antígeno-anticuerpo	Poco tiempo de reacción Temperatura no óptima
	Desarrollo del color	Alteración del marcaje Revelador inespecífico Tiempo de revelado Ausencia de unión antígeno anticuerpo
Postanalítica	Resultados inesperados	Fallas analíticas Saturación de la reacción Pérdida de la linearidad Alteración de la curva estándar Error en los cálculos

TABLA 3. Reporte de resultados para ELISA.

Cualitativos	Semicuantitativos	Cuantitativos
Presencia (+)	Negativo: 0-20 unidades	Negativo: < 20 mg/dl
Ausencia (-)	Positivo débil: 20-40 unidades	Muestra 1: 50 mg/ dl
	Positivo: 40-60 unidades	Muestra 2: 150 mg/dl
	Altamente positivo: > 60 unidades	

El valor negativo es calculado de acuerdo con el punto de corte.

Punto de corte

Es el valor de la densidad óptica (DO) más bajo, que puede ser traducido a concentración en forma confiable, capaz de descartar la DO emitida por el ruido de fondo o "background".

La curva de referencia

Éste es el único parámetro que permite calcular datos cuantitativos como resultado de una ELISA. Asume que hay una relación linear entre la cantidad de color generado y la concentración del analito presente en la muestra. La linearidad de la curva dependerá de la adecuada concentración de la proteína de captura, la dilución de la muestra y el desarrollo de la técnica en cada uno de sus pasos. Las curvas de análisis para ELISA se expresan con coordenadas de logaritmo, concentración o semilogaritmo para el eje X, frente a la DO en el eje Y. Los cálculos finales de la linearidad y la correlación entre los valores del eje X con respecto al eje Y deberán calcularse por regresión linear, aplicando la siguiente ecuación:

Y = Intercepto + Pendiente (X) ó Log Y = Intercepto + Pendiente (Log X)

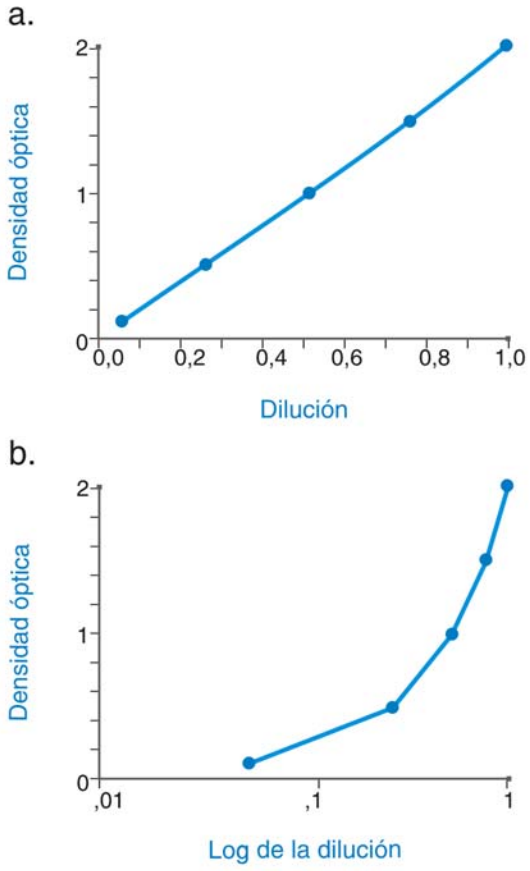


FIGURA 9.
Gráfica de la curva de análisis de resultados por regresión logística.
a. Gráfica linear correspondiente a la correlación entre la concentración del antígeno o anticuerpo (dilución) en la muestra vs la DO detectada por la absorbancia de la reacción. b. Curva correspondiente a la correlación entre el logaritmo de la concentración del antígeno o anticuerpo (dilución) en la muestra vs el logaritmo de la DO detectada por la absorbancia de la reacción.

Una correlación adecuada será expresada por un coeficiente de correlación (r^2) cercano a 1 (Figura 9).

Límite inferior

Es el valor de DO correspondiente al ruido de fondo, bien sea detectado por una reacción en la cual estén presentes todos los reactivos, excepto la muestra (blanco) o por una reacción cuya muestra sea considerada como el control negativo. Un buen límite inferior es aquel cuya DO no sea cero (0), pero que sea lo suficientemente bajo como para no enmascarar reacciones débilmente positivas en las muestras a analizar.

Títulos

Tienen que ver en forma directa con la concentración de la muestra en la reacción y con el punto de corte establecido en la prueba. Los títulos comenzarán a detectarse una vez superado el límite inferior fijado para la prueba y podrán expresarse como la concentración de analito presente en la muestra capaz de ser detectado por la prueba.

Lecturas recomendadas

1. Kemeny DM. A practical guide to ELISA. London: Pergamon Press, 1991
2. Reed R, Holmes D, Weyers J, et al. Immunological methods. In: Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A, editors. Practical skills in biomolecular sciences. London, Longman LTDA, 2000:97-99
3. Hamilton RG, Normansell DE. General methods: Antibody-based and molecular. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, DC, ASM press, 2002:5-25

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

Abatacept, 455
Aborto, 337
Acetilación, 482
Adalimumab, 435
ADCC, 68
Adenosina deaminasa, 468
Adenovirus, 470
ADP-ribosiltransferasa (PARP), 214
AINE, 269, 408, 416
Albúmina sérica bovina, 321
Aleatorización mendeliana, 198
Alefacept, 456
Alelo, 135
Amiloidosis renal, 404
Amplificado, 310
Anakinra, 458
Analito, 326
Andrógenos, 307
Anemia hemolítica, 266
Anergia, 91
Anexina V, 281, 289
Angeítis aislada del SNC, 391
Angiorresonancia, 389
Anillaje, 308
Anticardiolipinas, 266, 279, 288, 290
Anticoagulante lúpico, 266, 278, 288, 290
Anticuerpos
Anticuerpos 326, 333
Anticuerpos anticélulas endoteliales (AECA), 147, 387
Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA), 152, 154, 260, 341, 386, 387, 388
Anticuerpos anti-ENA, 246
Anticuerpos antiendomisio, 348
Anticuerpos antifosfolipídicos, 147, 152, 233, 246, 276, 288
Anticuerpos antiinsulina, 322
Anticuerpos antiislotes (ICA), 325
Anticuerpos anti-La, 267, 298, 376
Anticuerpos anti-LKM1, 342, 343
Anticuerpos anti-membrana basal glomerular, 395
Anticuerpos antimitocondriales (AMAs), 354
Anticuerpos antimúsculo liso (SMA), 341
Anticuerpos antinucleares (ANAs), 246, 257, 298, 356
Anticuerpos antioncoproteínas, 244
Anticuerpos antiperoxidasa, 333
Anticuerpos antiprotrombina, 291
Anticuerpos anti-Ro, 267, 298, 376
Anticuerpos antitiroglobulina, 333
Anticuerpos antitiroideos, 319
Anticuerpos antitrombina III, 283
Anticuerpos anti-TSH, 333
Anticuerpos anti-β2GPI, 232
Anticuerpos de captura, 327
Anticuerpos detectores, 330
Anticuerpos humanos antiquiméricos, 444
Anticuerpos monoclonales, 389, 442
Anticuerpos naturales, 246
Antígeno, 326
Antígeno detector, 330
AP-1, 111
APO1, 214
Apoptosis, 30, 34, 47, 50, 60, 61, 65, 67, 72, 77, 86, 90, 94, 102-105, 124, 151-153, 171-182, 214, 262, 264, 303
Aquaporinas, 307
Arginina-vasopresina, 162
Arteriosclerosis, 130
Arteritis de células gigantes, 390
Arteritis de Takayasu, 390
Artritis inducida por adyuvante, 162, 490
Artritis reactiva, 400
Artritis reumatoide, 11, 148, 192, 204, 244, 276, 297, 419, 427, 432, 442, 445, 455, 460, 462, 472, 473, 483, 491, 494
Asepsia, 507
Asma, 130
Aspirina, 291, 391
Autoanticuerpos, 105
Autoanticuerpos, mecanismos de generación, 300
Autoantígenos, 60
Autocrina, 8
Autoinmunidad, 184
Autorreactivo, 68
Avidina, 326
Azatioprina, 269, 343, 359
Azul de tripano, 512

B

B220, 73
B7, 103
Bacilo Calmette- Guérin, 404
BAFF, Factor activador de linfocitos B de la familia del TNF, 79, 94, 302
BAK, 311
Balsas lipídicas, 92, 454
Basofilos, 25
BBL, 73
Bcl-2, 173, 214, 303
BCR, 52, 77
BHE, 364, 365
β2-glicoproteína 1 (β2-GPI), 147, 151, 152, 232, 277, 288
β2-microglobulina, 136, 407
β-GAL, 330
Bialélica, 17
Bilirrubina, 359
BioBreeding, ratones, 322
Bioseguridad, 506
Biotina, 326
Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS), 389
Bolsillo, 205
Borrelia burdgdorferi, 237
BP1+, 73
Bromocriptina, 164, 167
Busulfán, 491

C

C1-Inh, 46
C1q, 39
C2a, 39
C2b, 39
C3, 41
C4, 43
C5, 41
Cadena Invariable (Ii), 142
Calnexina, 141
Calreticulina, 141
Campilobacter, 404
Cáncer, 243-252
Capilar, 324
Caspasas, 172
CCR10, 457
CCR3, 379
CCR4, 457
CCR5, 354, 366, 379
CD1, 144
CD103, 108
CD11b/CD18, 85
CD14, 32
CD154, 86
CD19, 91
CD2, 456
CD20, 442
CD21, 91
CD22, 91
CD25, 322
CD28, 103, 177, 350, 454
CD3, 73, 325
CD32, 91
CD4, 72, 322
CD4+/CD25+, 73
CD4+/-CD8+, 102
CD40, 110, 303
CD40/CD40L, 65, 105
CD40L, 177
CD45, 85, 91, 341
CD5, 84, 246
CD72, 91, 94
CD8, 72, 262, 340, 354
CD8+/CD4-, 102
CD80, 112, 177, 366, 368, 454, 456,
CD80/CD86, 64
CD86, 112, 177, 368, 454, 455,
CD95, Fas, 262
CDCC, 50, 52
Célula dendrítica, 25
Célula plasmática, 88
Célula presentadora de antígenos, 61, 88, 340, 375
Células B del páncreas, 318
Células de Langerhans, 374
Células dendríticas, 368
Células dendríticas dérmicas, 375
Células endoteliales, 148
Células epiteliales biliares, 354
Células germinales, 469
Células somáticas, 469
Células T reguladoras, 322
Celulosa, 328
Centimorgans (cM), 194
Centrifugación, 503, 509
Centro germinal, 86
Centrómero, 379
Chapel Hill, consenso, 379, 387
Chaperonas, 140
Chlamydia pneumoniae, 366
Ciclofosfamida, 389, 394, 443, 491, 495
Ciclooxigenasa, 408, 417
Ciclosporina A, 311, 343, 395, 268, 359
CIITA, 139, 482
Cinetocoro, 379
Cirrosis biliar primaria, 354
Citomegalovirus, 283, 496
Citometría de flujo, 149, 511
Citoquinas, 122, 261
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), 50, 52, 151, 442
Citotoxicidad celular dependiente del complemento (CCDC), 442
Clamidia trachomatis, 404
CLIP, 142
Clon, 506
Cloroquina, 311
CLP2, 73
Código genético, 5
Codominancia, 135
Codones, 4
Coeficiente de correlación, 332
Coestimulación, 64, 75
Colágeno IV, 305
Colágeno tipo II, CII, 205
Colchicina, 359
Colegio Americano de Reumatología, 276, 386, 395, 494
Colitis ulcerativa, 400, 432, 476
Comorbilidad, 312
Complejo de ataque a membrana (CAM), 38
Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), 64, 85, 89, 134, 136, 204, 258, 340, 369, 375, 402, 454, 482
Complejo oxoácido ramificador dehidrogenasa, 356
Complejo oxoglutarato dehidrogenasa, 356

Complejo piruvato dehidrogenasa, 354, 356
Complejos inmunes, 260, 262, 378, 386
Complemento, 23-27, 37-47, 50, 53, 65-68, 137, 139, 151, 166, 215, 239, 258, 263
Concanavalina A, 341
Concordancia, 192
Conjugado, 331
Conteo celular, 512
Controles, 331
Cordón umbilical humano, 149
Correlación, 332
CpG, 32, 178, 480
CR2, 43, 66
Crioglobulinas, 266
Cromatina, 5, 7, 9, 15
Cromosoma, 5
CTLA-4, 65, 104, 213, 321, 332, 350, 368, 454
CTLA-4Ig, 116, 368, 455, 456
Cuerpos nucleares, 356
Cultivo primario, 506
Curva de referencia, 332
Curvas de disociación, 525

D

Dactilitis, 401
DAF, 38
DCCT, Diabetes Control and Complications Trial, 327
ddNTPs (Dideoxinucleótidos), 323
Defensinas, 23
Demetilación del DNA, 482
Densidad óptica, 332
Deriva genética, 205
Dermatitis herpetiforme, 349, 382
Descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), 322
Desequilibrio de ligamiento, 136, 195
Desmogleína, 380
Desnaturalización, 309
DHEA, 188
Diabetes mellitus, 204, 212, 320, 429, 455, 471, 473, 476, 490, 495
Diapedesis, 27
Dímeros de iniciadores, 310
Discriminación alélica, 526, 527
Distancia genética, 195
DMARD, drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad, 494
DNA metiltransferasas, 480
DNA mitocondrial, 192
DNAds, 257, 260
dNTPs (Desoxinucleótidos), 309
D-penicilamina, 359
DRiPs, 142
Drosophila, 30, 177
dsRNA, 31
Duplicación génica, 134

E

Efalizumab, 457
Electroferograma, 324
Electroforesis, 323, 504
ELISA competitiva, 327
ELISA directa, 330
ELISA indirecta, 330
ELISA no competitiva, 326
ELISA sándwich, 326
ELISA, 149, 298, 380
ELISA, 326
ELP, 72
Encefalitis alérgica experimental (EAE), 34, 106, 206, 364, 368, 490
Endocrina, 8
Endotelina, 374
Enfermedad autoinmune (EAI), 104, 106, 184, 192, 204, 212
Enfermedad autoinmune tiroidea, EAT, 212
Enfermedad autoinmune, criterios, 185
Enfermedad autoinmune, inicio, 188
Enfermedad autoinmune, prevalencia, 187
Enfermedad celíaca, 319, 382, 491, 496
Enfermedad de Behcet, 396, 496
Enfermedad de Crohn, 400, 405, 432, 460, 476
Enfermedad de Dürhing, 349, 382
Enfermedad de Graves, 332
Enfermedad de Hodgkin, 246
Enfermedad de Kawasaki, 391
Enfermedad injerto contra huésped, 490, 492, 496
Enfermedades complejas, 192
Ensayo asimétrico, 327
Ensayo simétrico, 327
Enteropatías refractarias, 351
Enzima convertidora de angiotensina (ECA), 216
Eosina, 512
Eosinófilos, 24
Epialelo, 480
Epidemiología genética, 199
Epidermolisis bulosa adquirida, 382
Epigenética, 14, 17, 480
Epigenoma, 14, 16, 480
Epitope reumatoideo, 206
Epítopes crípticos, 176
Epítopes dominates, 176
Equilibrio Hardy-Weinberg, 205
Eritema malar, 265
ERp57, 141
Esclerodermia, 148, 150, 153, 378, 494, 495
Esclerosis Múltiple, 130, 204, 212, 364, 490, 494, 495
Escurfina, 111
Espondilitis Anquilosante, EA, 204, 400
Espondiloartropatías, 400
Estratificación genética, 196
Estrógenos, 162, 163, 164, 187, 264
Estructura cuaternaria, 4
Estructura secundaria, 4
Estructura terciaria, 4
Etanercept, 312, 395, 409, 434
Eucariotes, 5,7
Exclusión alélica, 15
Exonucleasa, 522
Exponencial, 521
Extensión, 308
Extinguidor (quencher), 522
Extracción, 501

F

Factor B, 38
Factor D, 38
Factor de Von Willebrand, 149
Factor H, 38
Factor I, 38
Factor reumatoideo, 91, 130, 246, 444
Factores transcripcionales, 8
Fagocitosis, 262
FAM, 324
Farmacogenómica, 444
Faros moleculares (molecular beacons), 522, 523
Fas, 303, 341
Fas/FasL, 214
Fase sólida, 326
FasL, 173, 354
FcγR, 262, 442, 444
FcγRI, 50
FcγRII, 50
FcγRIII, 50, 456
FcγRn, 50
Fenocopia, 193
Fenol, 502
Fenotipo, 193
Ficoll-Hypaque, 509
Fidelidad, 311
Fluorescencia, 324.
Fluorocromos, 324
FoB, 73
Folículo linfoide, 86
Fosa de unión a péptidos, 138
Fosfatasa alcalina, 330, 357, 358
Fosfatidilserina, 147, 151
FoxP3, 111
Fracción atribuible poblacional, 196
Fraccionamiento, 503
Fractalquina, 122
FRET, 522

G

Galectina, 108
Gamaglobulinas intravenosas, 268, 389, 391, 395
GCSF, Factor de crecimiento de colonias granulocíticas, 492, 494
Gemelos dicígotos, DC, 192
Gemelos monocígotos, MC, 192
Genes de supresión antitumoral, 245
Genoma, 4
Genómica, 199
GITR, 108
Glándula salivar, 296
Glándula salivar, biopsia, 298
Gliadina, 382
Glicolípidos, 144
Glicoproteína asociada a la mielina, 249
Globulina antitimocito, 495
Glucocorticoides fluorados, 291
Glucocorticoides no fluorados, 291
Glucocorticoides, 359, 424
Gluten, 348, 349
GM-CSF, 33
Granulomatosis de Wegener, 148, 392, 496
Granzima B, 173, 174, 176, 341, 354

H

HA 7.2, 208
HA 8.1, 208
Haplotipo ancestral, 208
Haptenos, 330
Helicobacter pylori, 236, 420
Hematocitómetro, 512
Hemicigótico, 16
Hemidesmosoma, 381
Hemimetilado, 15
Hemoglobina, 4
Heparina, 291
Hepatitis A, 342
Hepatitis autoinmune, 341
Heredabilidad, 192
Herencia, 136
Herencia multifactorial, 192
Herpes virus, 366, 470
Heterocigotos, 194
Hidroxicloroquina, 311
Hiperprolactinemia, 166, 167
Hipertensión arterial, 418, 420, 428, 492
Hipertensión pulmonar, 493, 494
Histonas, 7
HLA, 61, 136, 176, 185, 186, 204, 277, 309, 332, 349, 490
HLA-A, 139
HLA-B, 139
HLA-B27, 401
HLA-C, 139
HLA-DM, 142
HLA-DO, 142
HLA-DP, 139
HLA-DQ, 139
HLA-DR, 139
HLA-DR3, 320
HLA-DR4, 320
Homeodominios, 12
Homeostasis, 65

Homeostático, 123
Homocigotos, 194
Hormona del crecimiento, 164
Hormona liberadora de corticotrofina, 162
HRF, 38
HSP, 139

I

IA-2, 322
ICAM-1, 282, 457
ICE, 103, 458
IFNγ, 88, 89, 214, 262, 374, 343, 349, 380, 406
IgA, 366
IgD, 65, 366
IgG, 366
IgG1, 53
IgG2, 53
IgG3, 53
IgG4, 53
IgM, 65, 366
IKK, 76
IL-1, 213, 258, 349, 406
IL-10, 85, 89, 213, 262, 310, 349, 368,
IL-12, 34, 343, 366, 460,
IL-15, 350, 461
IL-18, 460
IL-1Ra, 458
IL-1β, 364
IL-2, 111, 261, 365, 460, 482
IL-4, 88, 214, 349
IL-6, 89, 214, 258, 459
Impronta, 17, 18
Infección, 232, 428
Inflamación, 26
Infliximab, 312, 395, 409, 435
Iniciadores (Primers), 308
Inmunidad innata, 21, 239
Inmunodeficiencia combinada severa (SCID), 87
Inmunoensayo, 326
Inmunofluorescencia indirecta, 148, 356, 388
Inmunoglobulina A, 395
Inmunoprecipitación, 149
INR, Índice normalizado ratio, 285
Insulina, 221, 321, 327
IP-10, 366
IPEX, 111
IRAK, 32
Islas CpG, 22
ITAM, 50, 79, 90, 91
Iκβ, 81

J

Jaccoud, artropatía, 265
JOE, 324

K

Klebsiella pneumonie, 407
Knockout, 221
Knodell, evaluación histológica de, 341

L

LADA, diabetes autoinmune latente del adulto, 318
Laminina, 305
Langerina, 375
LCR, 364, 366
Lectina ligadora de Manosa, 23, 40, 215
Lenercept, 437
Leucemia murina, 470
Levotiroxina, 334
LFA-1, 457
LFA-3, 456
Libman-Sacks, endocarditis, 265, 280
Ligamiento, 193
Línea celular, 506, 508
Linfocito B, 72, 299
Linfocitos B autorreactivos, 84, 175
Linfocitos B, ontogénesis, 85
Linfocito T, 72, 99, 299
Linfocito T αβ, 72
Linfocito T γδ, 72
Linfocitos T autorreactivos, 175, 176, 189, 365
Linfocitos T citotóxicos, 304
Linfocitos T reguladores, 189
Linfocitos Intraepiteliales, 23, 348
Linfocitos intrahepáticos, 340
Linfoma no Hodgkin, 442
Linfoma tipo MALT, 297
Linfotoxina A, 88
Linfotoxina B, 88
Lipopolisácaridos, LPS, 22, 30
Lisis, 502
Livedo reticularis, 280, 376
LMP2, LMP7, 142
Loci, 194
Lod score (λ), 192
LT CD4+, 59
LT CD4+/CD25+, 59
LT CD8+, 59
Ludwig, clasificación de, 358
Lupus discoide, 265
Lupus eritematoso cutáneo subagudo, 375, 376
Lupus eritematoso sistémico (LES), 11, 17, 47, 148, 164, 165, 192, 204, 212, 244, 255-274, 376, 442, 491,494
Lupus inducido por medicamentos, 267
Lupus neonatal, 267
Luz ultravioleta, 188, 264, 375
Lymphoprep, 510
Lymphopure, 510

M

Macrófagos, 24
MAG, 366
MALT I, 81
MAPKs, 32
Marcaje enzimático, 330
Mastocitos, 25
Medio ambiente, 264
Melfalán, 491
Memoria inmunológica, 60
Metformina, 327
Metilación, 14, 15, 480
Metiltransferasa, 15
Metimazol, 336
Método enzimático, 323
Método químico, 322
Metotrexate, 359, 395, 442
Miastenia gravis, 369
MICA, cadena relacionada a moléculas de clase I no clásicas del MHC, 350
Micofenolato mofetil, 268, 269, 343, 371, 395
Microesferas, 511
Microsatélites, STRs, 194
Mielina, 130
Mieloperoxidasa, 379, 392, 395
MIIC, 142
Mimetismo molecular, 188, 232
MIP-1α,366
MIP-1β, 366
MIRR, 51
Mitosis, 5
MODY, Diabetes juvenil de comienzo en el adulto, 318
MOG, 364, 366
Monoalélica, 16
mRNA, acido ribonucléico mensajero, 85, 89
Mucinas, 308
MyD88, 32
MZB, 73

N

Nefritis lúpica, 265
NEMO-IKK, 81
Neoplasia, 130
Neurofilina, 108
Neuromiotomía, 249
NF-AT, 111
NFkB, factor nuclear kappa-beta, 14, 32, 81, 407, 426
Nicotinamida, 325
Nidógeno, 305
Nikolski, signo de, 380
Nitrocelulosa, 328
NK, natural killer, 73, 262, 340, 374
NKT, 145
NOD ratones, 322
Normalización, 525
Notch, 72
Nucleosoma, 6, 7

O

ODN, 33, 482
Oligonucleótidos, 308
Oncógenos, 244
Onercept, 437
Órganos linfoides secundarios, 86
Ornitina decarboxilasa, 164
Osteoartropatía hipertrófica, 248
Osteoporosis, 428
Osteoprotegerina, 358
OX40, 108
Oxido nítrico sintasa, NOS, 216
Óxido nítrico, 305, 364

P

P4, 205
P53, 244, 245
Panarteritis nodosa, 391
Panvasculitis, 153
Paracrina, 8
Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), 22, 30, 374
PCR en tiempo real, 522
PCR, Proteína C reactiva, 23
PCR-RFLP, 526
PDCD1, 214
Pegsunercept, 437
Penetrancia, 193
Pénfigo eritematoso, 381
Pénfigo foliáceo, 381
Pénfigo inducido por drogas, 381
Pénfigo neonatal, 381
Pénfigo paraneoplásico, 381
Pénfigo vulgar, 380
Pénfigo, 380
Penfigoide ampolloso, 381
Penfigoide cicatrizial, 382
Penfigoide gestacional, 381
Penfigoide, 381
Péptido, 137, 205
Peroxidasa de rabano, HRP, 330
PKCs, 76
Placenta, 289
Plasmaféresis, 389
Plasmodium vivax, 130
PLCγ, 51
Pleiotrópismo, 122
Poder estadístico, 196
Poliangeítis microscópica, 393
Polimialgia reumática, 390
Polimorfismo, 135
Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), 194, 213
Post-PCR, 312
Potenciadores (enhancers), 10
Pre T, 72

Prednisolona, 343
Pre-PCR, 312
Presentación cruzada, 142
Primer dimer, 310
Pro B, 73
Procariotes, 5, 7
Progestágenos, 162
Progesterona, 188
Prolactina, 162, 164, 166, 188, 264
Prolaminas, 348
Propagación del epítope, 188
Properdina, 38
Prostaciclina, 289
Prostaglandinas, 416
Proteína básica de mielina, 206, 365
Proteína C Reactiva, 215, 258, 267, 388
Proteina de mielina de oligodendrocitos, 206
Proteína ligadora de manosa, 258, 374
Proteína proteolipídica, PLP, 206
Proteinasa 3, 154, 379, 392
Proteinasa K, 502
Protrombina, 281
PRR, 22, 30
Prueba de desequilibrio de trasmisión TdT, 195
Psoriasis, 455, 457, 463
PTK, 79
Punto de corte, 332
Púrpura de Schölein-Henoch, 395
Púrpura trombocitopénica trombotica (PTT), 152, 284, 496

Q

QTL, 193
Quimioquinas, 122

R

RANKL, 358
RANTES, 366
Raynaud, fenómeno de, 249, 357
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 307
Reactantes de fase aguda, 162
Receptor de la acetilcolina (AchR), 369
Receptor de linfocito T (TCR), 60, 100, 340, 374
Receptor de linfocito B (BCR), 60, 85, 89
Receptor de prolactina, 164
Receptor de vitamina D (VDR), 222, 354
Receptor OX40 (OX40L), 88
Receptor tipo Toll (TLR), 26
Receptores endocíticos, 26
Receptores Fc, 215
Receptores tipo Toll, 239, 374
Regulador autoinmune (AIRE), 321
Residuo de anclaje, 206
Resonancia magnética nuclear, 389, 401
Respuesta adaptativa (específica), 122
Respuesta innata, 122
Retículo endoplásmico, 142
Retrovirus, 470
Reumatismo postquimioterapia, 249
Riesgo relativo, 205
Rituximab, 268, 312, 395, 396, 441-452
RNA polimerasa (RNApol), 9, 11
ROX, 324
Rubeóla, 321
RUNX, 11

S

Saccharomyces cerevisae, 237
Sacroiliítis, 402
Salmonella typhi, 282
Salmonella, 404
Sanger, 323
sCTLA-4, 116
Secuencia complementaria, 323
Secuenciación automática, 324
Secuenciación, 321
Sedimentación, 508
Selección clonal, 60, 63
Selección negativa, 72, 512
Selección positiva, 512
Selección, 205
Selectina-E, 457
Selectinas, 128
Senescencia, 506
Sensibilidad, 311
Sensibilización, 328
SF-36, cuestionario, 389
Shigella, 404
SHIP, 52
SHP, 52
Sialoadenitis crónica, 298
Sialoadenitis focal, 298
Silenciamiento, 16
Síndrome antifosfolipídico, 232, 496
Síndrome antifosfolipídico catastrófico, 281
Síndrome antifosfolipídico primario, 276
Síndrome antifosfolipídico secundario, 276
Síndrome antifosfolipídico y embarazo, 281
Síndrome anti-Hu, 246
Síndrome CREST, 358
Síndrome de Budd-Chiari, 277
Síndrome de Canale-Smith, 374
Síndrome de Churg-Strauss, 394
Síndrome de Evans, 266, 278
Síndrome de Guillain-Barré, 280
Síndrome de hombre rígido, 249
Síndrome de Lambert-Eaton, 246, 248
Síndrome de POEMS, 248
Síndrome de Reiter, 405
Síndrome de Senear-Usher, 381
Síndrome de Sjögren, 204, 296
Síndrome de Sneddon, 280
Síndrome de Sweet, 248
Síndrome hemolítico urémico, 151
Síndromes paraneoplásicos, 247
Sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal, 162
Sistema inmunoneuroendocrino, 162, 263
SLEDAI, 267, 495
Smith, antígeno, 257, 260
Solenoide, 6, 7
Sondas de hibridación, 525
Sondas de hidrólisis, 522
Sondas escorpión, 524
SP-40, 41
Splicing, 5, 6, 12
Streptococcus pyogenes, 237
Streptomyces, 321
Subcultivo, 506
Superparamagnético, 511
Sustancia P, 162
Sustrato, 331
SYBR Green I, 525

T

T reg., 59, 109, 176, 189
TAMRA, 324
TAP, 66, 141, 218
TAP1/TAP2, 204
Tapasina, 141
Taq DNA polimerasa, 308
Taqman, 522, 523
TCR, 72, 482
TE (Tris-EDTA), 311
Templado, 308
Terapia génica, 467
Tetracicilina, 409
TGFβ, 109, 323, 349, 368, 454
Th0, 122
Th1, 59, 88, 89, 104, 122, 124, 163, 262, 322, 354, 374
Th2, 59, 88, 89, 104, 122, 124, 163, 262, 322, 354, 374
Th3, 59, 109, 122
Tiempo de protrombina, 358
Timomas, 370
TIR, 30
TIRAP, 32
Tiroglobulina, Tg, 224
Tiroiditis de Hashimoto, 297, 332
Títulos, 332
TLR, 177
Tm, 310, 527
TNF, 88, 139, 173, 213, 258, 349, 364, 366, 426, 432, 433, 456, 459, 494
Tolerancia, 60, 90, 102, 184, 188, 349
Tomografía axial computarizada, 389
Toxoplasma gondii, 130
Tr1, 59, 109
Transglutaminasa tisular, 348, 382
Trasplante autólogo, 490
Trasplante de células madre hematopoyéticas, 489-498
Trasplante hepático, 359
Trasplante singénico, 490
Trasplante xenogénico, 490
Trimetropin-Sulfametoxazol, 395
Trombocitopenia, 278
Tromboxano, 289, 417
Trosseau, signo, 283
TSH, 224

U

Umbral, 192

V

Vacunación, 327
Vasculitis crioglobulinémica, 396
Vasculitis Damage Index (BDI), 389
Vasculitis, 150, 388-398
Vasculopatía, 289
VDRL, 278
Vector, 470
Veneno de la víbora de Russell, 279
Vía endogena, 142, 143
Vía Exógena, 142, 143
Viabilidad, 512
Virología, 506
Virus Coxsackie, 321
Virus de la Hepatitis B, 386, 391, 342
Virus de la Hepatitis C, 342, 391, 386
Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), 283, 386, 391, 405
Virus de la Vacuna, 236, 238
Virus Epstein-Barr, 85, 238, 302, 366
VNTR, 216, 221, 321
Von Willebrand, factor, 284

W

Western blot, 380

X

Xeroftalmía, 296, 297
Xerostomía, 296, 297

Y

Yersinia, 404
Yeyunoileítis ulcerativa, 351
Yodo, 335
Yoduro de propidio, 512

Z

Zona marginal, 86